

MISE EN ÉVIDENCE DE L'IMPACT DES SIDÉROPHORES DANS L'IMMUNITÉ DES
PLANTES ET ÉVALUATION DU POTENTIEL CLINIQUE DES CONJUGUÉS
ANTIBIOTIQUES-SIDÉROPHORES

Par

Fabrice Betoudji

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mars 2020

Le 6 mars 2020

Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Fabrice Betoudji dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur François Malouin
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Kamal Bouarab
Codirecteur de recherche
Département de biologie

Professeure Carole Beaulieu
Évaluatrice interne
Département de biologie

Professeure Pascale Beauregard
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Les bactéries peuvent être à la fois nos amies et nos ennemies. Nos amies parce qu'elles nous assistent de plusieurs manières : par exemple dans la digestion de nourritures ainsi que dans le renforcement de notre système immunitaire. En revanche, certaines d'entre elles se retournent contre les organismes supérieurs (les mammifères, les plantes, etc.).

Les plantes et les mammifères sont constamment confrontés aux attaques des bactéries pathogènes ; et ceci représente une menace de plus en plus sérieuse pour les êtres humains. D'un côté, les bactéries pathogènes contre les plantes d'intérêts agricoles causent des pertes de production et donc une menace pour le monde à l'accès à la nourriture ; de l'autre, celles pathogènes contre les mammifères représentent une menace pour la santé publique, car beaucoup d'entre elles ont réussi à acquérir des résistances contre les antibiotiques utilisés pour les éliminer. Ces menaces émanant des bactéries pathogènes requièrent donc une constante vigilance afin de mieux les contrôler. La bonne nouvelle, c'est que le mieux nous connaissons les stratégies d'attaque de nos adversaires, le mieux équipés nous serions pour parer à leurs assauts. Les connaissances que nous possédons des bactéries (pathogènes comme non-pathogènes) à date est qu'elles ont besoin, à l'image de la plupart des organismes vivants, de nutriments de base pour se multiplier. L'un de ces nutriments dont les bactéries ne peuvent se passer est le **fer**. Pour s'acquérir de cet ion dans les environnements où la biodisponibilité du fer est faible (hôtes plantes et mammifères), les bactéries produisent de molécules de petits poids moléculaires appelées sidérophores. Ces sidérophores produits vont aller dans l'environnement des bactéries, chélater le fer présent et le leur ramener. Ceci représente le maillon faible dans l'épanouissement des bactéries et peut donc être exploité pour cibler les bactéries pathogènes aussi bien pour les plantes que les mammifères. C'est ce que nous avons essayé de faire dans ces études car nous savons que les bactéries bénéfiques du sol, appelées aussi *plant growth-promoting rhizobacteria* ou PGPR, assistent les plantes dans leur nutrition, croissance et défense. La question était d'explorer si les sidérophores bactériens pouvaient jouer un certain rôle dans la défense des plantes. D'autre part, nous savons aussi que certaines

bactéries ne produisent pas seulement les sidérophores, mais ajoutent une ogive aux sidérophores pour les transformer en puissantes armes contre les compétiteurs possédant les machineries d'utilisation de leurs sidérophores ; c'est le cas de l'albomycine qui a une structure chimique très similaire à celle du sidérophore ferrichrome. Les bactéries compétitrices se trouvant dans l'environnement de celles produisant l'albomycine et possédant les machineries d'utilisation du ferrichrome vont donc indistinctement internaliser l'albomycine, qui va donc effectuer son action antibiotique une fois internalisée. On pourrait donc imiter les bactéries en attachant des antibiotiques aux sidérophores produits exclusivement par certains genres bactériens pour cibler ces derniers.

Lors des études entreprises dans le cadre de cette maîtrise, il a été démontré d'une part que : les sidérophores synthétiques imitant les structures chimiques de ceux naturels produits par certaines bactéries bénéfiques du sol (*Acinetobacter* spp.) ont un effet antimicrobien *in vitro* contre un pathogène de plantes, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) ; ont induit la résistance de la plante de référence, *Arabidopsis thaliana* contre *Pst* DC3000 ; ont induit certains marqueurs moléculaires de défense (*PR1*) contre *Pst* DC3000 ; ont promu la croissance d'une PGPR de référence, *Bacillus subtilis*, *in vitro*, dans les conditions pauvres en fer. Par ailleurs, le conjugué synthétique antibiotique dont une partie contient l'analogue synthétique du sidérophore naturel (fimsbactine) produit par *Acinetobacter baumannii*, est très actif contre cette espèce bactérienne. En revanche, l'antibiotique utilisé (daptomycine) pour la conjugaison, seul n'a aucune activité contre *A. baumannii*. La daptomycine qui est un antibiotique utilisé exclusivement en clinique contre les bactéries à Gram positif. À cause de son grand poids moléculaire, la daptomycine ne peut pas traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Cependant, lorsqu'elle est couplée à un sidérophore d'une bactérie à Gram négatif, le conjugué ainsi obtenu est activement transporté à l'intérieur de celle-ci afin d'exercer son effet bactéricide. Ces projets d'études ont permis de démontrer les multiples façades des sidérophores et les nombreuses possibilités d'exploitation des sidérophores aussi bien en agriculture qu'en santé humaine. Cependant, beaucoup reste à faire afin de comprendre pleinement les mécanismes moléculaires permettant aux bactéries d'acquérir les nutriments

qui leur sont vitaux, et donc de mieux combattre celles qui représentent une menace pour l'agriculture et la santé humaine.

Mots clés : fer, sidérophores, fimsbactine, conjugués antibiotiques-sidérophores, daptomycine, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Acinetobacter baumannii*, résistance aux antibiotiques, immunité des plantes.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, Dr. François Malouin, Ph. D., de l'opportunité qu'il m'a accordée en travaillant sur ces divers projets dans son laboratoire. Je le remercie également de m'avoir rassuré et me faire senti comme chez moi quand je venais de joindre nouvellement son équipe de recherche. Cette immense gratitude va également à l'égard de mon co-directeur de recherche, Dr. Kamal Bouarab, Ph. D., qui a toujours laissé sa porte ouverte pour discuter aussi bien des avancées de mes recherches que pour prodiguer de conseils d'ordre général. Ces reconnaissances s'adressent aussi à mes conseillères, Dre. Carole Beaulieu, Ph. D. et Dre. Pascale Beauregard, Ph. D., pour toutes les suggestions édifiantes lors de nos rencontres. Ces recherches n'auraient pas été réalisées sans la collaboration du laboratoire du Dr. Marvin J. Miller, Ph. D. de l'Université de Notre-Dame. En effet, c'est Dr. Miller et toute son équipe qui ont mis à notre disposition les sidérophores synthétiques ainsi que les conjugués antibiotique-sidérophore qui ont permis de réaliser ces études. Je leur en suis donc infiniment reconnaissant.

Pour ces discussions et blagues et sorties pour le lunch, je remercie profondément tous les membres du laboratoire Malouin : Jean-Philippe Langlois, Guillaume Millette, Diana Vanessa Bran-Barrera, Julie Beaulieu, Alexis Dubé-Duquette, Éric Brouillette, Julie Côté-Gravel, Élodie Demontier, Évelyne Lacasse, Charles Isabelle, Audrey Larose, Dominique Pellerin aussi bien que tous les anciens et actuels stagiaires, et ceux du laboratoire Bouarab : Refka Ajmi, Marie Bernadette Dibor Diam, Taha Abd El Rahman et Rocío González-Lamothe. Sachez que ces moments resteront à jamais inoubliables dans ma mémoire et seront toujours chéris. J'exprime également ma reconnaissance aux organismes subventionnaires sans lesquels, les projets n'auraient pas vu de réalisation ; je pense notamment au Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), pour leur appui financier.

J'aimerais finalement remercier ma famille, mes feux parents, mes frères et sœurs pour les supports de tout genre et plus particulièrement à mes deux adorables filles et ma femme pour leur soutien et amour inconditionnels pendant mes études.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS.....	iiiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ivviii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES.....	xixi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Systèmes de transport du fer chez les plantes	1
1.1.1. Stratégie basée sur l'oxydoréduction ou stratégie I	2
1.1.2. Stratégie basée sur la chélation ou stratégie II.....	2
1.2 L'importance du fer dans l'interaction plante-agent pathogène.....	5
1.2.1 Rôle des rhizobactéries dans la santé des plantes	7
1.2.2 Rôles des SID dans l'assimilation du fer par la plante.....	7
1.2.3 Rôle des SID dans la défense de la plante contre les agents phytopathogènes.....	8
1.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des plantes	10
1.3.1 PAMP-Triggered Immunity (PTI) ou résistance basale.....	11
1.3.2 Effector-Triggered Immunity (ETI).....	12
1.4 Les phytohormones : acide salicylique, acide jasmonique et éthylène	13
1.5 Résistance systémique acquise (SAR) et résistance systémique induite (ISR).....	16
1.6 L'importance du fer chez les organismes vivants	17
1.7 Systèmes de transport du fer chez les microorganismes	18
1.8 Transport à partir des sidérophores	18
1.8.1 Transport à partir des SID chez les bactéries à Gram négatif	19
1.8.1.1 Reconnaissance du complexe SID-Fe ³⁺ par un récepteur de la membrane externe	19
1.8.1.2 Transfert du complexe SID-Fe ³⁺ vers le périplasme.....	20
1.8.1.3 Présentation du complexe à la membrane cytoplasmique.....	20
1.8.1.4 Translocation du complexe dans le cytoplasme	21

1.8.1.5 Réduction de la forme ferrique du fer et libération du SID et de son recyclage	21
1.8.2 Transport à partir des SID chez les bactéries à Gram positif	23
1.8.3 Transport à partir des protéines de l'hôte	24
1.9 Régulation et homéostasie du fer	25
1.10 Systèmes de transport du fer chez <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
1.11 Systèmes de transport du fer comme cible thérapeutique	37
1.12 Conjugués sidérophores-antibiotiques naturels : principe du cheval de Troie.....	37
1.12.1 Conjugués sidérophores-antibiotiques : principe du cheval de Troie	40
1.12.1.1 Revue sur les SID-ATB.....	40
1.12.1.2 Sidérophores-antibiotiques synthétiques spécifiques contre <i>A. baumannii</i> ..	43
1.13 Projets de maîtrise : Objectifs et approches générales	48
CHAPITRE 2: ARTICLE SCIENTIFIQUE	50
2.1 Résumé en français de l'article	50
2.2. L'article scientifique	52
CHAPITRE 3: MATÉRIEL ET MÉTHODES	73
3.1 Détermination de l'activité inhibitrice des conjugués ATB-SID contre les différentes souches d' <i>A. baumannii</i> et relation structure-activité selon le profil d'utilisation des SID par la bactérie	73
3.1.1 Souches bactériennes	73
3.1.1.1 Activité inhibitrice	73
3.1.1.2 Relation structure-activité selon le profil d'utilisation des SID par les souches d' <i>A baumannii</i>	75
3.1.1.3 Séquençage des mutants résistants d' <i>A. baumannii</i> obtenu par Illumina	76
3.2 Étude comparative de la virulence des mutants résistants par rapport au parent dans le modèle murin d'infection intrapéritonéale	77
CHAPITRE 4: RÉSULTATS ASSOCIÉS AUX ATB-SID	79

4.1. Détermination de l'activité inhibitrice du conjugué DAP-SID (HT-10) contre <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et un mutant (MM2-R1) en présence du conjugué.....	79
4.2. Propriétés des conjugués synthétiques ATB-SID	83
4.3 Profil d'utilisation des SID par la souche sauvage ATCC 19606 et le mutant MM2-R1	84
4.4 Virulence relative des mutants résistants aux ATB-SID dans un modèle d'infection chez la souris	87
CHAPITRE 5: DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	94
BIBLIOGRAPHIE	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS

hpi	heures post-infection
ABC	ATB Binding Cassette
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Acb	Acinéto bact ine
AJ	Acide jasmonique
ANOVA	Analysis of Variance
AS	Acide salicylique
ATB	Antibiotique
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtCOI1</i>	<i>Coronatine insensitive (A. thaliana)</i>
<i>AtETR1</i>	<i>Ethylene Response 1</i>
<i>AtFER1</i>	Ferritine (<i>A. thaliana</i>)
<i>AtJAZ</i>	<i>Jasmonate Zim domain</i>
ATP	Adenosine Triphosphate
AZA	Azelaic acid
AZI1	<i>Azelaic acid-induced 1</i>
BAK1	<i>BR11-associated receptor kinase 1</i>
Bau	Baumannoferrine
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
CAMHB	<i>Cation-adjusted Mueller-Hinton broth</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratories Standards Institute</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DAP	Daptomycine
DFO	Deferoxamine

DHBA	2,3- acide dihydroxybenzoïque
ERF	<i>Ethylene Response Factor</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus...</i>
ESKAPE	<i>Klebsiella, pneumoniae, Acinetobacter baumannii...</i>
ESKAPE	<i>Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.</i>
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
FER1	Ferritine 1
Fim	Fimbsactine
FIT	<i>Fer-Like Iron Deficiency-Induced Transporter Factor</i>
flg22	Flagelline
FLS2	<i>Flagellin-Sensing 2</i>
FMO1	<i>Flavin-dependent-MonoOxygenase 1</i>
FQRNT	Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies
FRO2	<i>Ferric Reductase Oxidase 2</i>
Fur	<i>Ferric-uptake regulator</i>
HypP	<i>Hypothetical protein</i>
IM	Intramusculaire
IP	Intrapéritonéale
IRT1	<i>Iron-Regulated Transporter 1</i>
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i>
Lf	Lactoferrine
LRR-RK	Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns
MC	Membrane cytoplasmique
ME	Membrane externe
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NPR1	<i>Non-expressor of PRI Gene</i>
NRAMP	Natural Resistance-Associated Macrophage

PBP	Penicillin-Binding Protein
PDF1	<i>Plant Defensin 1</i>
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
PR1	<i>Pathogenesis-Related 1</i>
Pré-Acb	Pré-Acinétobactine
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PS	Phytosidérophores
<i>Pst</i> DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato DC3000
PTI	<i>PAMP-Triggered Immunity</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RR	<i>Regulator Response</i>
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>
SID	Sidérophores
SID2	<i>Salicylic Acid Induction Deficient 2</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SOD	Superoxyde dismutases
T1SS	<i>Type 1 Secretion Systems</i>
T3SS	<i>Type 3 Secretion Systems</i>
TBDP	<i>TonB-Dependent Protein</i>
Tf	Transferrine
TOM1	<i>Transporter of Mugineic acid 1</i>
UMP	<i>Uncharacterized Membrane Protein</i>
YS1	<i>Yellow Stripe 1</i>
YSL	<i>Yellow Stripe 1-Like</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des amorces utilisées dans cette étude	68
Tableau 2: Liste des mutants résistants et les conjugués utilisés pour leur sélection ainsi que les protéines fréquemment mutées	783
Tableau 3: Tableau représentant les propriétés des conjugués ATB-SID contre les souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	833

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma représentant les deux stratégies d'acquisition du fer chez les plantes	4
Figure 2 : Modèle de la régulation par les hormones de la régulation du fer dans la stratégie I	10
Figure 3: La voie de biosynthèse de l'acide jasmonique à partir de l'acide α -linoléinique	15
Figure 4: Systèmes de transport du fer indirect par les sidérophores chez les bactéries à Gram négatif,	23
Figure 5: Schéma représentatif de la répression médiée par Fur	27
Figure 6: Schéma représentant la modulation par RyhB du fer libre intracellulaire	28
Figure 7: Structures moléculaires d'Acb (gauche) d' <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et d'anguibactine (droite) de <i>Vibrio anguillarum</i> 774	30
Figure 8: Carte physique du cluster de gènes de production et d'utilisation d'Acb chez <i>A. baumannii</i> . ATCC 19606	31
Figure 9: Affinités dépendantes du pH de BauA pour pré- Acb et Acb	33
Figure 10: Modèle proposé montrant la compétition entre Fim et PreAcb/Acb pour la protéine périplasmique BauA .	35
Figure 11: Schéma représentant les structures du ferrichrome (gauche) et de l'albomycine (droite)	38
Figure 12: Structure chimique du céfiderocol	42
Figure 13: Structure du conjugué SID mixte-carbacéphalosporine (1b)	44
Figure 14: Schéma représentant les structures chimiques des trois conjugués SID-DAP	47
Figure 15: Chemical structures of fimsbactin A and its synthetic analog, SID	55
Figure 16: Effect of synthetic siderophores on growth of <i>Pst</i> DC3000, <i>B. subtilis</i> and of <i>A. baumannii</i>	58
Figure 17: The synthetic SID induces systemic resistance of <i>Arabidopsis</i> Col-0 against <i>Pst</i> DC3000.	60
Figure 18: SID induces systemic priming of PR1. Relative expression of the SA pathway marker, PR1 (A) and the JA pathway marker, PDF1.2 (B).	62
Figure 19: Inhibition d' <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 par le conjugué HT-10 (bandelette verticale)	80
Figure 20: Inhibition d' <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 (A ou gauche) et du mutant résistant MM2-R1	81
Figure 21: Inhibition d' <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 (A ou gauche) et du mutant résistant MM2-R1	82

Figure 22: Profils d'utilisation des SID par la souche sauvage ATCC 19606 (haut) et son mutant résistant au SID mixte-DAP, MM2-R1(bas).	85
Figure 23: Compte bactérien dans le sang des souris 20h après infection par <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.	88
Figure 24: Compte bactérien dans le foie des souris 20h après infection par <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.	89
Figure 25: Compte bactérien dans la rate des souris 20h après infection par <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.	90
Figure 26: Compte bactérien dans les reins des souris 20h après infection par <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.	91
Figure 27: Compte bactérien dans les poumons des souris 20h après infection par <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.	92

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Systèmes de transport du fer chez les plantes

Le fer est un élément qui joue un rôle essentiel dans la santé et la croissance d'une plante. De plus, pour l'alimentation et la santé humaine, la concentration optimale du fer dans les différentes parties comestibles de la plante est d'une importance primordiale. L'acquisition du fer par les plantes se fait principalement à partir de la rhizosphère. Cependant, le fer n'est pas toujours libre en quantité suffisante pour celles-ci, car sa disponibilité dépend de plusieurs facteurs dont le pH et le potentiel d'oxydoréduction du sol, entre autres. Il est en forme libre dans le sol à des pH acides; tandis que dans les sols à pH basiques ou aérobiques, il est rapidement oxydé en oxydes de fer, et donc insoluble. Le fer est impliqué dans plusieurs processus importants (ex : photosynthèse, respiration) pour le bon fonctionnement des cellules. Une fois rendu dans la plante via ses racines, il est pris en charge par les métalloprotéines qui ont pour fonction, entre autres, de le distribuer dans toute la cellule et de contrôler son homéostasie pour ainsi optimiser le fonctionnement et l'intégrité de la cellule. Une carence en fer peut se traduire par une chlorose et un affaiblissement du fonctionnement d'une cellule. Les stratégies d'acquisition ou de transport du fer du sol diffèrent chez les plantes, selon qu'il s'agisse des graminacées ou non. Chez les non-graminacées (par ex : *Arabidopsis thaliana*), la stratégie d'acquisition du fer est celle basée sur l'oxydoréduction du fer ou encore stratégie I; alors que les graminacées, de leur côté, utilisent une stratégie basée sur la chélation du fer par de petites molécules appelées phytosidérophores, ou encore la stratégie II.

1.1.1. Stratégie basée sur l'oxydoréduction ou stratégie I

La plante modèle *A. thaliana* a été utilisée pour la caractérisation extensive de la stratégie I. Dans les conditions de déficience en fer, le facteur de transcription FIT (*Fer-Like Iron Deficiency-Induced Transporter Factor*) est activé, de concert avec d'autres facteurs de transcription de type bHLH (*basic helix-loop-helix*); soit bHLH038 ou bHLH039, pour induire l'expression des gènes de réponse à la carence en fer (Cointry, 2019; Ivanov et al., 2012). Cette stratégie implique le pompage de protons dans la rhizosphère par les pompes protons (H^+) ATPases de la membrane plasmique dans le but d'acidifier le milieu (Santi & Schmidt, 2009; Palmgren, 2002). Chez *A. thaliana*, il existe plusieurs H^+ -ATPases, appelées AHA ou *Autoinhibited H⁺-ATPase*, dont AHA1, AHA2 et AHA7 qui sont retrouvées principalement dans les cellules épidermiques des racines (Hoffmann et al., 2018). Une fois que la rhizosphère est acidifiée, il se produit alors une réduction de la forme ferrique (Fe^{3+}) du fer en sa forme ferreuse (Fe^{2+}) médiée par la réductase de la membrane plasmique, FRO2 (*Ferric Reductase Oxidase 2*), qui est spécialement exprimée dans les racines en réponse à une carence en fer (Mukherjee et al., 2006). C'est la forme ferreuse (Fe^{2+}) du fer qui est transportée à travers les membranes des cellules racinaires par le transporteur IRT1 (*Iron-Regulated Transporter 1*) ; IRT1 ayant une très grande affinité au Fe^{2+} . Cependant, cette affinité s'applique à d'autres ions divalents (Mn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+}), quoi qu'elle soit de moindre magnitude (Cointry, 2019).

1.1.2. Stratégie basée sur la chélation ou stratégie II

La stratégie II implique la sécrétion par les graminacées de molécules de petits poids moléculaires, appelées phytosidérophores (PS), qui sont des chélateurs du fer. Il existe différents types de PS : les acides muginéiques, la nicotianamine et les acides avéniques (Dotaniya et al., 2013; Sugiura & Nomoto, 2007). Contrairement aux sidérophores (SID) bactériens composés de groupement fonctionnel hydroxamate ou phénolate, les PS sont des

amino-acides composés de groupements amine, carboxylique et hydroxylique permettant de coordonner le fer (Sugiura & Nomoto, 2007). Dans les conditions appauvries en fer, les graminacées produisent, à partir de la méthionine, la nicotianamine, qui va ensuite être convertie en PS à l'aide des enzymes telles que la nicotianamine aminotransférase et l'acide déoxymuginéique synthase (Bashir et al., 2006; Ohata et al., 1993; Verbon et al., 2017). Les PS produits sont alors sécrétés dans le sol grâce au transporteur, TOM1 (*Transporter Of Mugineic acid 1*) et vont chélater le Fe^{3+} se trouvant dans la rhizosphère, formant ainsi le complexe PS- Fe^{3+} . Ces complexes PS- Fe^{3+} peuvent ensuite être importés dans la racine avec l'assistance de transporteurs spécifiques tels que YS1 (*Yellow Stripe 1*) (Guerinot et Yi, 1994; Morrissey et Guerinot, 2009; Thomine et Vert, 2013; Connorton et al., 2017; Verbon et al., 2017). Il faut ajouter que les PS ne sont pas spécifiques aux ions ferriques, car ceux-ci peuvent également chélater d'autres métaux tels que le Zn, le Cu et le Ni (Morrissey et Guerinot, 2009). Les mécanismes généraux d'acquisition du fer issus des stratégies I et II sont présentés dans la figure 1.

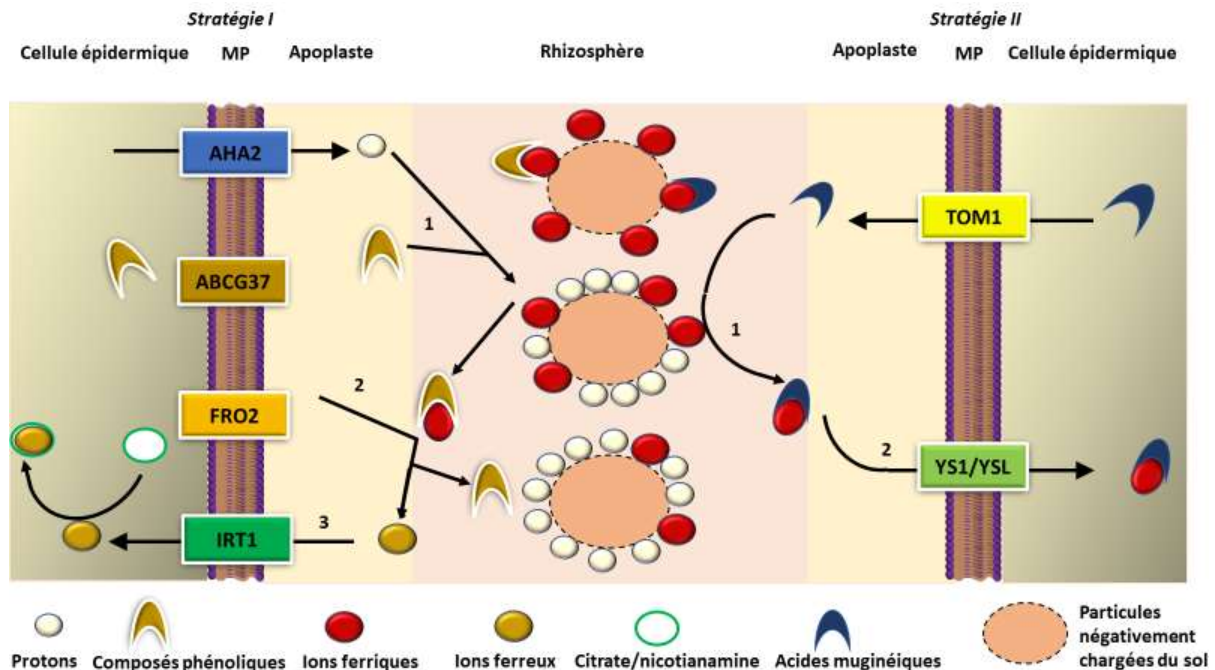


Figure 1: Schéma représentant les deux stratégies d'acquisition du fer chez les plantes (Naranjo-Arcos & Bauer, 2016). Abréviations : ABCG37 : *ABC transporter G family member 37* ; AHA2 : *Autoinhibited H⁺-ATPase 2* ; FRO2 : *Ferric Reduction Oxidase 2* ; IRT1 : *Iron-Regulated Transporter 1* ; TOM1 : *Target of Myb protein 1* ; YSL : *Yellow Stripe 1-Like* ; YS1 : *Yellow Stripe 1*. À gauche, la stratégie I (*A. thaliana*) qui consiste à pomper les protons par les pompes aux protons AHA2 afin d'acidifier le sol. La solubilisation du fer est facilitée par la sécrétion des composés phénoliques, sécrétés par le transporteur ABCG37. Une fois que le fer est solubilisé, la réductase FRO2 réduit la forme ferrique du fer en forme ferreuse qui est ensuite transportée dans la cellule épidermique par le transporteur IRT1. Lorsque le fer est dans la plante, soit le citrate ou la nicotianamine se charge de son acheminement dans divers compartiments à travers le xylème ou le phloème. Dans la stratégie II, à droite (riz, maïs etc.), deux étapes sont impliquées : premièrement, les PS produits chez la plante sont exportés par le transporteur TOM1 dans la rhizosphère. Les PS vont alors solubiliser les ions Fe³⁺. Le complexe PS-Fe³⁺ est ensuite transporté vers la plante par le

transporteur YS1 dans le cas du maïs et de YSL (Yellow Stripe 1-Like) pour les autres graminacées (Naranjo-Arcos & Bauer, 2016).

1.2 L'importance du fer dans l'interaction plante-agent pathogène

Le fer étant l'un des éléments les plus abondants sur terre (Zhang et al., 2009), c'est bien naturel que l'évolution l'ait incorporé dans les plus importantes fonctions biologiques. En revanche, même très abondant, il n'est pas toujours soluble et donc biodisponible pour les organismes vivants. C'est pour cette raison qu'il y a un combat acharné entre, par exemple, les bactéries et les eucaryotes pour l'accès à ce très précieux élément. Autant le fer est important pour les fonctions biologiques, autant il devient toxique pour les organismes vivants lorsque présent en très grande quantité, en raison notamment de sa forte réactivité, engendrant les stress oxydatifs. C'est d'ailleurs à cause de cette toxicité, que les organismes vivants ont mis en place de systèmes spécialisés pour maintenir le taux du fer intracellulaire à un niveau optimal, donc son homéostasie (Andrews, 2003). Un petit déséquilibre du niveau du fer pourrait avoir une conséquence désastreuse pour la cellule. Le souci pour la stabilité de cette composante physiologique est à l'interface dans le combat entre bactéries et eucaryotes, y compris bactéries et plantes. Chez la plante, une carence en fer se traduit par une chlorose et une diminution de son fonctionnement global. Pour infecter la plante, l'acquisition du fer est la plus importante des réponses adaptatives par les agents pathogènes (Verbon et al., 2017). Or, le fer n'étant pas en libre circulation et en quantité suffisante pour la bactérie, celle-ci, afin de palier à cette situation, sécrète de composés de petits poids moléculaires, appelés sidérophores (SID) pour se procurer du fer de son hôte, comme cela a été mentionné plus-haut. Ceci a pour conséquence l'établissement d'une déficience en fer chez l'hôte et donc sa détérioration. Pour déjouer cette stratégie, les animaux ont mis en place des récepteurs de type sidérocaldines, entre autres les lipocalines, pour reconnaître et se lier à ces SID, ce qui limite la disponibilité du fer aux agents pathogènes (Neumann, et al., 2017). De plus, ce complexe Sidérophore-sidérocaldines (lipocalines) induit l'immunité chez les mammifères, ce qui accélère la destruction de l'agent pathogène (Nairz, et al., 2015; Soares et Hamza, 2016). Les protéines NRAMP (*Natural*

Resistance-Associated Macrophage Proteins) sont des métalloprotéines qui ont pour fonction, entre autres, de lier le fer, de le distribuer dans toute la cellule et de contrôler son homéostasie pour ainsi optimiser le fonctionnement et l'intégrité de la cellule. Les protéines NRAMP contribuent aussi à l'activation de l'immunité chez les animaux en cas de carence de fer causée par les SID sécrétés par les agents pathogènes (Vidal, et al., 1993; Forbes et Gros, 2001; Soares et al., 2016) et sont aussi présentes chez les plantes. Il a été montré que des SID peuvent agir comme des activateurs de l'immunité menant à une résistance envers certains agents pathogènes comme la bactérie *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) et le champignon *Botrytis cinerea* chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Dellagi, et al., 2009 ; Aznar, et al., 2014; Aznar et Dellagi, 2015). De plus, NRAMP3 et 4 ainsi que les marqueurs de la déficience en fer qui sont *IRT1* et *FRO2* contribuent à la résistance mise en place chez *A. thaliana* contre la bactérie *Erwinia chrysanthemi* (Segond, et al., 2009). Une autre protéine de la plante qui est impliquée dans l'homéostasie du fer, contribue également à la mise en place de la résistance basale de la plante : la ferritine chez *A. thaliana* (*AtFER1*) est surexprimée lorsque la plante est infectée avec l'agent pathogène *Dickeya dadantii* (connue aussi comme *E. chrysanthemi*) ou encore infiltrée avec l'*apo*-chrysobactine et l'*apo*-desferrioxamine, suggérant ainsi le rôle de la ferritine dans la prévention de la prolifération de l'agent pathogène et donc de la résistance de la plante (Dellagi et al., 2005). En outre, la voie de l'AS est activée à la suite du traitement des feuilles d'*A. thaliana* par l'*apo*-chrysobactine et l'*apo*-desferrioxamine, menant à la surexpression, entre autres, du gène de défense *PR1* et l'accumulation de la ferritine par *AtFER1* (Dellagi et al., 2009). Du fait que l'*apo*-chrysobactine et l'*apo*-desferrioxamine peuvent induire la surexpression d'acteurs de l'immunité innée, ils jouent donc le rôle d'éliciteurs de défense de la plante et cette défense passe par la voie de l'AS (Dellagi et al., 2009). Cependant, même si les signaux pour le manque de fer envoyé par les SID des bactéries permettent aux plantes d'activer leur défense et de résister à ces agents pathogènes bactériens, ceci n'est pas forcément le cas pour tous les agents pathogènes d'origine fongique. En effet, il a été observé que l'insuffisance du fer dans l'environnement rend plus susceptibles certaines plantes comme les arachides et les tomates, pour ne citer que celles-ci, aux infections par le champignon *Verticillium dahliae* (Barash et

al., 1988). En revanche, chez un autre champignon pathogène, *Botrytis cinerea* et la bactérie pathogène, *D. dadantii*, il a été observé un effet contraire; la carence en fer chez la plante lui permet de mieux résister à ces deux agents pathogènes; alors que cette résistance est diminuée une fois qu'on supplémente la plante avec le fer (Kieu et al., 2012). Il faut noter que dans la littérature scientifique, il est en général observé que la carence en fer est bénéfique pour la plante contre les agents pathogènes bactériens, alors qu'avec les agents pathogènes fongiques, cette carence en fer a des résultats variables (Verbon et al., 2017).

1.2.1 Rôle des rhizobactéries dans la santé des plantes

Il y a dans le sol, au contact des racines, plusieurs espèces bactériennes qui sont bénéfiques aux plantes. Ces bactéries bénéfiques sont appelées, en anglais, *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR). Les PGPR sont avantageuses pour la plante en stimulant chez celle-ci, dépendamment de circonstances environnementales : i) la mise en place de la résistance systémique induite (ISR) contre des agents pathogènes (Bakker et al., 2007), ii) sa résistance à la sécheresse (Vurukonda et al., 2016), iii) la bioremédiation de l'environnement contaminé avec des métaux lourds toxiques et autres composés chimiques dangereux pour l'environnement (Glick, 2010; Tak et al., 2014;), iv) la réduction de l'excès du sel dans l'environnement (Vives-Peris et al., 2018); v) la mobilisation de nutriments tels que le fer, l'azote, le phosphore ainsi que la production de SID et d'antibiotiques et la détoxification de facteurs de virulence des agents pathogènes (Compant et al., 2010; Compant et al, 2005).

1.2.2 Rôles des SID dans l'assimilation du fer par la plante

Le rôle bénéfique des SID microbiens pour les plantes qui leur procurent du fer pour leur bonne croissance est bien connu (Crowley, 2006); cependant, le mécanisme exact impliqué reste inconnu. Quelques hypothèses de mécanismes d'acquisition du fer par la plante à partir des SID microbiens ont été avancées : a) le fer chélaté par les sidérophores bactériens passerait par plusieurs protéines sécrétées par la plante avant d'être utilisé par cette dernière (Vansuyt, et al.,

2007b); b) les complexes SID microbiens chélatent le Fe^{3+} et le passent directement aux PS (Masalha et al., 2000). Toutefois, il existe dans la littérature des observations selon lesquelles les plantes sont capables d'assimiler le fer directement à partir des SID microbiens (Bar-ness et al., 1992; Vansuyt et al., 2007). Il a été notamment observé que le Fe^{3+} complexé au SID bactérien (pyoverdine) est plus efficacement incorporé dans *A. thaliana* que quand celui-ci est complexé à un chélateur synthétique (EDTA) (Vansuyt et al., 2007a). Zhang et al. (2009), de leur côté, ont utilisé une souche PGPR de *Bacillus subtilis* GB03 pour mieux comprendre la contribution de ces PGPR dans l'assimilation de certains nutriments, y compris le fer, par les plantes. L'observation tirée de cette étude est que GB03 active les systèmes d'acquisition du fer de la plante (*A. thaliana*) en induisant la surexpression du facteur de transcription *FIT1*, qui est requis pour activer les marqueurs du stress de la carence en fer que sont *FRO2* et *IRT1*. De plus, GB03 acidifie directement (production de composés organiques volatiles) et indirectement (pompage de protons) le sol, facilitant ainsi l'assimilation d'autres nutriments et l'efficacité de la photosynthèse (Zhang et al., 2009). Pour finir, il faut ajouter que même si beaucoup de recherches sur l'utilisation des SID microbiens par les plantes ont été effectuées, il reste néanmoins beaucoup de zones d'ombres quant aux mécanismes moléculaires exacts de leur utilisation.

1.2.3 Rôle des SID dans la défense de la plante contre les agents phytopathogènes

Comme mentionné plus-haut, les SID microbiens, notamment ceux provenant de la famille de *Pseudomonadaceae*, agissent comme éliciteurs de la résistance systémique induite chez les plantes (Bakker et al., 2007; Leeman et al., 1996). Cependant, comme abordé dans la section 2.2, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette activité d'élicitation ne sont pas très bien caractérisés. Il a été observé par exemple que la chrysobactine (CB), sécrétée par l'agent pathogène *D. dadantii* dans des conditions pauvres en fer, stimule de manière systémique, la colonisation de la plante entière. En revanche, l'infiltration foliaire de CB initie l'activation des marqueurs de réponses liées à l'insuffisance du fer et celle de la voie de défense de l'acide

salicylique (AS), indispensable pour la défense contre *D. dadantii* (Dellagi et al., 2009; Dellagi et al., 2005). En plus de AS et AJ, plusieurs autres hormones et petites molécules telles que l'oxyde nitrique (NO) sont impliquées dans l'homéostasie du fer chez la plante (Hindt et Guerinot, 2012). Les hormones telles que l'auxine, l'éthylène et NO jouent le rôle de régulateurs positifs en réponses à la carence en fer (fig. 2), car ces hormones sont impliquées dans l'activation de FIT1, FRO2 et IRT1, acteurs majeurs de la stratégie I (section 1.2) d'acquisition du fer (Hindt et Guerinot, 2012). Par contre, certaines hormones telles que l'AJ, les brassinostéroïdes et la cytokinine agissent comme des régulateurs négatifs de la réponse à la carence en fer; l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer (*FIT1*, *IRT1* et *FRO2*) est inhibée après traitements de ces hormones (Hindt et Guerinot, 2012). En bref, les SID pourraient être reconnus par les plantes comme des signaux d'une attaque d'agents pathogènes et les inciter à activer la mise en place de leur système de défense. Deux voies immunitaires peuvent alors être induites à la suite de la reconnaissance de ces signaux; soit une résistance de type basale qui, repose sur la reconnaissance de l'agent pathogène via les PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*), et une résistance spécifique, qui repose sur une reconnaissance de type gène-pour-gène. Les PAMPs sont en générale des molécules très conservées et peu variables, trouvées chez un grand nombre de microbes (par ex. la chitine, la flagelline, les lipopolysaccharides, etc). Ces molécules sont reconnues grâce à certains récepteurs transmembranaires appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) qui induisent ce qu'on appelle le PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), qui est capable d'arrêter la plupart des agents pathogènes, sans nuire toutefois à la plante. En revanche, certains agents pathogènes sont capables de supprimer la voie PTI en produisant des protéines, appelées effecteurs, qui agissent directement sur le récepteur PRR ou en aval de celui-ci (Dodds et Rathjen, 2010). C'est ici qu'entre en jeu la deuxième voie immunitaire où, pour déjouer cette stratégie, les plantes ont élaboré une autre résistance hautement spécifique leur permettant de reconnaître ces effecteurs. Cette résistance, appelée ETI (*Effector-Triggered Immunity*), implique le produit d'un gène de résistance présent chez la plante et capable de « sentir » les dommages causés par un effecteur encodé par le génome de l'agent pathogène et ainsi induire l'immunité

(Dodds et Rathjen, 2010). Je reviendrai en détail sur la PTI, l'ETI, l'AS et l'AJ/Éthylène (ET) dans la section suivante.

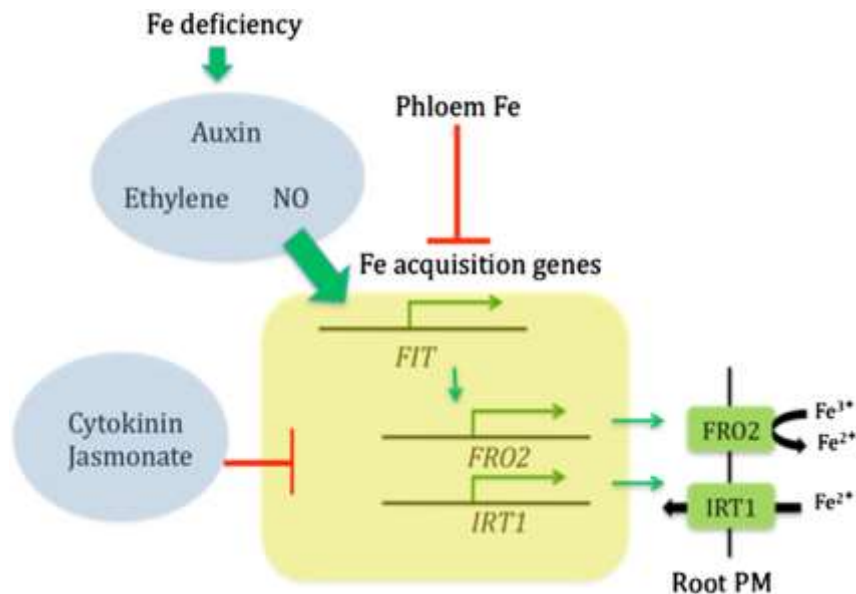


Figure 2 : Modèle de la régulation par les hormones de la régulation du fer dans la stratégie I (Hindt et Guerinot, 2012). L'auxine, l'éthylène et le NO agissent comme régulateurs positifs sur l'expression des gènes d'acquisition du fer FIT, FRO2 et IRT1. En revanche, la cytokinin et les jasmonates agissent tels de régulateurs négatifs des gènes FRO2 et IRT1, indépendamment de la régulation du niveau d'expression du gène FIT. Le fer contenu dans le phloème servirait de régulateur négatif des gènes impliqués dans l'acquisition du fer par la plante (Hindt et Guerinot, 2012).

1.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des plantes

Contrairement aux mammifères qui possèdent des cellules immunitaires mobiles ainsi qu'une immunité somatique adaptative, les plantes doivent dépendre de chacune de leurs cellules et des signaux systémiques envoyés à partir de différentes régions infectées pour se défendre contre les infections (Dangle et Jones, 2001). De ce fait, elles utilisent diverses stratégies afin

de faire face aux stressés aussi bien biotiques (bactéries, champignons, nématodes, etc.) qu'abiotiques (froid, chaleur, sécheresse, etc.). Dépendamment de leur mode de vie, les agents phytopathogènes sont classés en nécrotrophes ou en biotrophes (Glazebrook, 2005). Les nécrotrophes se nourrissent en détruisant leurs cellules hôtes par des phytotoxines et des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire ; alors que les biotrophes s'alimentent à partir de nutriments pris des tissus vivants. Tel que mentionné dans la section précédente, la plante répond à ces différents stressés soit par une résistance basale, en reconnaissant les motifs moléculaires conservés (PAMPs) des agents pathogènes grâce à ses récepteurs transmembranaires PRR, induisant ainsi la PTI ; soit par une réponse de défense hautement spécifique, ETI, lorsqu'une protéine de résistance de la plante arrive à identifier les dommages causés par un effecteur produit par l'agent pathogène. Que ce soit la voie de défense PTI ou ETI, la plante utilise des signaux de défense, y compris les hormones telles que l'AS, l'AJ et l'ET. Ces hormones vont induire l'activation des gènes de défense pour faire face à l'attaque. Il y a beaucoup de phytopathogènes qui adoptent les deux modes de vie. Les détails sur chacune des composantes de défense de la plante sont donnés dans les sections qui suivent.

1.3.1 *PAMP-Triggered Immunity* (PTI) ou résistance basale

La première ligne de défense de la plante contre les infections est l'identification de motifs moléculaires conservés, PAMPs. Le terme PAMPs est peut-être spécifique aux agents pathogènes; c'est pourquoi certains auteurs utilisent le terme MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) à la place de PAMPs (Ausubel, 2005). Il y a une très grande diversité moléculaire chez les MAMPs; on retrouve chez ceux-ci des protéines (flagelline le facteur d'élongation Tu), des sucres (chitine) ainsi que de lipopolysaccharides (LPS). La plante est également capable d'identifier les DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) qui sont les produits de dégradation suite à l'activité de l'agent pathogènes (Choi et Klessig, 2016). Les PAMPs, DAMPs et MAMPs sont reconnus par certains récepteurs transmembranaires appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), qui vont induire les réponses de défense. Les interactions PRR/PAMP les plus caractérisées à date sont : i) celle entre la LRR-RK de *A. thaliana* (*leucine-rich repeat receptor kinase*)-FLS2 (*flagellin-sensing2*), qui reconnaît le

domaine N-terminal de la flagelline, représenté par l'épitope contenant 22 acides aminés (flg22) (Nürnberg et Kemmerling, 2006) ; ii) celle entre le récepteur EF-Tu (EFR) qui arrive à reconnaître le domaine de l'épitope contenant 18 acides aminés (elf18) du facteur d'élongation EF-Tu d'*E. coli* (G. Kunze, 2004). La perception de la PAMP par la PRR entraîne un changement de conformation qui amène le récepteur à interagir avec des kinases du genre corécepteur comme BAK1 (*BRI-associated kinase 1*) (Jia et al., 2002), qui va ensuite entraîner une cascade de signalisation faisant appel à des MAP kinases et des facteurs de transcriptions WRKY conduisant ultimement à l'activation des gènes de défense (Jones et Dangl, 2006a).

1.3.2 Effector-Triggered Immunity (ETI)

La voie de réponse ETI est une voie hautement spécifique, entraînant une réponse de défense plus vigoureuse que la voie PTI. Les bactéries pathogènes les plus prolifiques arrivent à inhiber effectivement la voie de défense PTI, se servant de leurs systèmes de sécrétion de type 3 (T3SS), pour injecter des effecteurs directement dans le cytoplasme de cellules de plantes. Pour combattre ces effecteurs, la plante produit des protéines spécifiques codées par les gènes de résistance R. À la suite de la reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance R, ceux-ci deviennent avirulents (avr). Plusieurs effecteurs ont été récemment identifiés chez *Pst* DC3000 comme interférant avec les réponses de défense basales induites par flg22 ; c'est le cas des effecteurs AvrPto et AvrPtoB (connus aussi comme HopAB2) qui sont identifiés comme de puissants supprimeurs du PTI (Jones et Dangl, 2006b). AvrPtoB est capable de supprimer la voie de l'acide salicylique permettant ainsi à la bactérie de proliférer dans la plante (Jones et Dangl, 2006b). En plus d'effecteurs bien identifiés, il y a d'autres petites molécules bactériennes, notamment les toxines qui agissent comme des effecteurs, ciblant les réponses de défense. L'exemple de toxine agissant comme un effecteur est la coronatine, produite par *Pst* DC3000 ; la coronatine mimique l'acide jasmonique et contrecarre la réduction de l'ouverture de stomates induite par les MAMP (Melotto et al., 2006).

L'induction chez la plante des résistances du type ETI et PTI nécessite la synthèse et la perception de signaux de défense, incluant des hormones, dont les mieux caractérisées actuellement sont l'AS, l'AJ et l'ET (Tsuda et al., 2008).

1.4 Les phytohormones : acide salicylique, acide jasmonique et éthylène

Toutes les phytohormones sont impliquées dans l'immunité de la plante ainsi que dans des réseaux hormonaux régulant diverses réponses liées au stress et au développement. De toutes les phytohormones, l'AS, l'AJ et l'ET constituent le noyau de l'immunité modulée par ce groupe de molécules (Pieterse et al., 2012). AS est considéré comme un régulateur positif de l'immunité impliquant les agents phytopathogènes biotrophes et hémibiotrophes, tandis que AJ et ET sont des régulateurs positifs de l'immunité dirigée contre les agents phytopathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Ces composés de faible masse moléculaire sont de puissants inducteurs de toute une panoplie de gènes de défense et sont responsables de la mise en place d'une bonne partie des réponses requises pour contrer les agents pathogènes. En fait, chacun de ces régulateurs contrôle un spectre particulier de réponses de défense. Par exemple, l'augmentation des taux endogènes d'AS, un composé phénolique issu du métabolisme des phénylpropanoïdes, est requise pour l'expression de certains gènes qui codent pour des protéines dites *Pathogenesis-Related* (PR), qui présentent des propriétés antimicrobiennes comme la PR1 (Glazebrook, 2005). Cette résistance locale est suivie d'une résistance systémique acquise permettant alors à la plante entière de se protéger contre l'agresseur (Tsuda et al., 2008). La reconnaissance de PAMPs et d'effecteurs d'agents pathogènes au moment de la PTI ou de l'ETI déclenche la biosynthèse de l'AS (Mishina et Zeier, 2007). L'activité de l'AS à la suite de sa biosynthèse est sous le contrôle de la protéine régulatrice nommée *Non-Expressor of PR1 Gene* (NPR1) qui, agit comme un coactivateur de transcription d'un large spectre de gènes de défense (Yan et Dong, 2014). NPR1 est sous forme d'oligomère dans le cytoplasme lorsque les taux de l'AS sont bas ; cependant, lorsque les taux de l'AS augmentent, les oligomères se dissocient en monomères, à cause de la réduction des ponts disulfures attachant les monomères ensemble. Les monomères peuvent alors rentrer dans le noyau pour

interagir avec les facteurs de transcription de type TGA et induire la transcription des gènes de défense (Broekgaarden, et al., 2015).

Au cours d'une attaque d'un agent pathogène ou d'insectes, la biosynthèse de l'AJ est initiée dans les chloroplastes, et commence avec la libération de l'acide α -linoléique des membranes lipidiques (fig. 3), et passe par la voie de l'oxylipine (Pieterse et al., 2012; Tsuda et Somssich, 2015; Browse, 2005). Après sa biosynthèse, AJ est rapidement converti en une molécule hautement bioactive appelée, jasmonoyl-isoleucine ou AJ-Ile (Mosblech et al., 2009; Fonseca et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, l'ubiquitine ligase E3 AtCOI1 (coronatine-insensitive1) repère l'AJ-Ile, et conséquemment initie la dégradation des protéines AtJAZ (*Jasmonate Zim domain*) qui jouent le rôle de régulateurs négatifs de la signalisation de la voie de l'AJ (Sheard et al., 2010; Pauwels et al., 2010). Lorsque AJ est activé, il y a rupture physique de l'interaction entre AtJAZ et les facteurs de transcription; ce qui a comme conséquence la dérégulation de la voie de signalisation de l'AJ et donc de l'activation de gènes de la voie de l'AJ (Memelink, 2009).

La voie de signalisation ET est également activée en réponse aux infections et suite à la perception de MAMPs tels que la flagelline ou le facteur d'élongation (EF)-TU par les protéines PRRs (Boller et Felix, 2009). À la suite de la perception de MAMPs par les protéines PRRs, une prompt production de l'ET suite à l'activation de la voie de signalisation MAPK conduit à une mise en place effective de réponses de défense PTI (Broekgaarden, 2015). Après sa production, l'ET se lie à ses récepteurs tels que AtETR1 (*Ethylene Response 1*) menant à l'activation des facteurs de transcriptions tels que ERF (*Ethylene Response Factor*) qui jouent un rôle très important dans la régulation de défenses en aval de l'activation de l'ET (Binder, 2008).

L'AJ et l'ET agissent en synergie pour activer l'expression d'autres gènes de défense incluant le gène PDF1 (*Plant Defensin 1*) (Glazebrook, 2005). Cependant, la voie de signalisation de l'ET et de l'AJ peuvent interférer avec celle de l'AS, avec comme exemple la liaison directe de AtEIN3 au promoteur AtSID2, empêchant l'expression de SID2 ainsi que compromettant l'accumulation de l'AS (Chen et al., 2009).

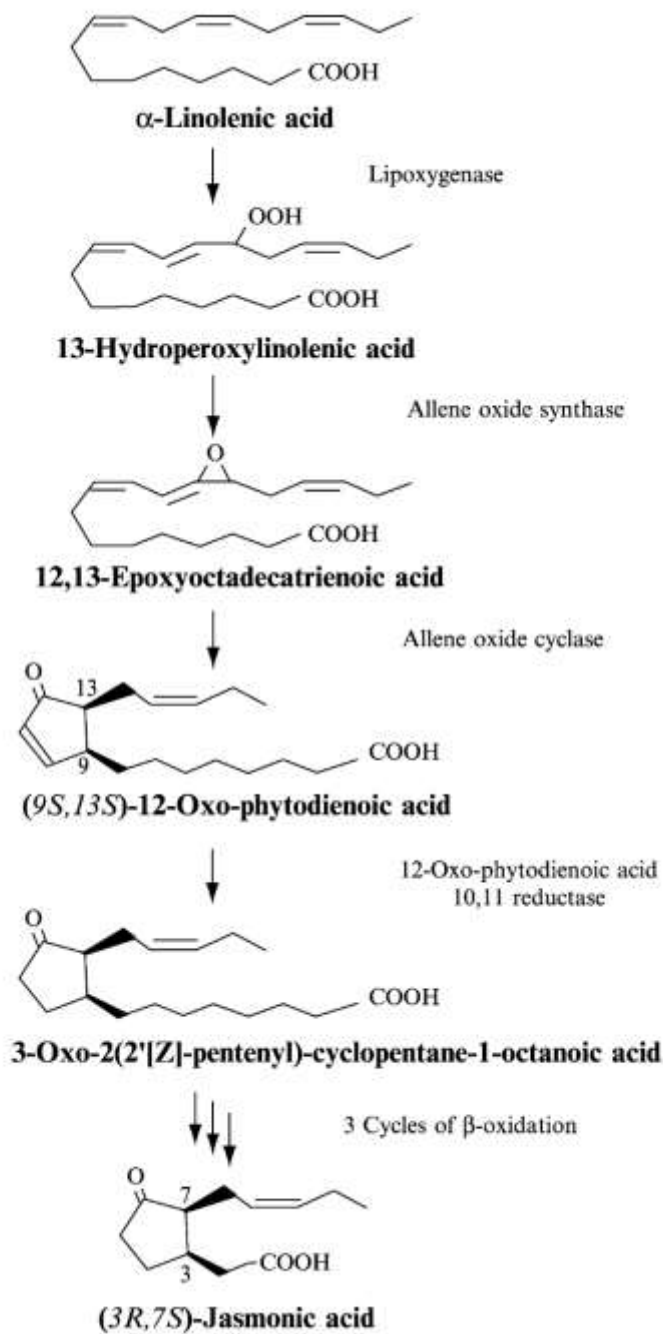


Figure 3: La voie de biosynthèse de l'acide jasmonique à partir de l'acide α -linolénique (Browse, 2005)

1.5 Résistance systémique acquise (SAR) et résistance systémique induite (ISR)

La résistance systémique acquise (*SAR* ou *Systemic Acquired Resistance*) est le phénomène par lequel les plantes arrivent à établir une résistance acquise à la suite d'un contact initial avec un agent pathogène, non seulement au site d'infection mais aussi dans des tissus distants n'ayant pas été en contact avec l'agent pathogène (Fu et Dong, 2013). Cette résistance de la plante suite au contact initial avec un agent pathogène passe par l'accumulation de l'hormone de défense AS ainsi que par la production des protéines antibactériennes PR (Fu et Dong, 2013). Par ailleurs, les bactéries bénéfiques du sol (*PGPR*) induisent également chez les plantes une résistance contre les agents pathogènes ; c'est l'amorçage (ou *priming*) et cette forme de résistance est appelée résistance systémique induite (*ISR* ou *Induced Systemic Resistance*). Les signaux de l'*ISR* sont envoyés alors à partir des racines vers les parties aériennes de la plante (Pieterse et al., 2014). Il existe des acteurs moléculaires majeurs impliqués dans la mise en place de l'*ISR*. Il a été montré par exemple que l'acide azélaïque (AZA) est impliqué dans l'amorçage (*priming*) de l'immunité chez *Arabidopsis* en consolidant le niveau de l'AS et l'accumulation des transcrits de *PR1* à la suite d'un challenge avec *Pst* DC3000 (Jung, 2016). De plus, le marqueur de l'acide azélaïque, *AZII* (*azelaic acid-induced 1*) est bien caractérisé pour son rôle dans l'amorçage de l'immunité systémique et son induction de AZA chez *Arabidopsis* (Cecchini et al., 2015; Cecchini et al., 2019). Un autre acteur de l'immunité systémique chez la plante (*Arabidopsis*) est le gène *FMO1* (*Flavin-dependent-MonoOxygenase 1*) (Hartmann et al., 2018). FMO1 intervient dans les étapes initiales de la résistance systémique acquise (Mishina et Zeier, 2006), et la réponse d'amorçage par la voie de l'AS dépendrait de FMO1 via la voie de l'acide pipécolique (Bernsdorff et al., 2016).

1.6 L'importance du fer chez les organismes vivants

Le fer est le quatrième élément le plus abondant sur la terre ; il n'est donc que naturel que l'évolution de la vie sur terre l'ait assimilé comme un cofacteur pour beaucoup de protéines. À quelques exceptions près (lactobacilles et *Borrelia burgdorferi*), virtuellement chez tous les organismes vivants, le fer est un élément essentiel (Troxell, et al., 2012). Le fer a de fonctions nombreuses et diverses chez les organismes vivants, avec beaucoup de processus biologiques dépendant de sa disponibilité. Quoique très abondant sur terre, le fer n'est pas toujours accessible aux organismes, se retrouvant en majorité sous sa forme oxydée. Étant donc indispensable aux organismes supérieurs (mammifères, plantes, etc.) ainsi qu'aux microorganismes, le fer se trouve être à l'interface du combat pour les nutriments entre ces différents règnes, plus particulièrement entre les bactéries agents pathogènes et leurs hôtes mammifères et plantes. Lorsqu'elles infectent leurs hôtes, l'acquisition du fer est la plus importante des réponses adaptatives des bactéries agents pathogènes. Or, chez l'hôte mammifère, le fer disponible est presque toujours lié aux protéines spécifiques comme la transferrine, la lactoferrine ou la ferritine, laissant une très petite quantité (10^{-18}M) soluble, et insuffisante pour une croissance optimale des agents pathogènes. Ceci représente une barrière pour les agents pathogènes qui ne peuvent acquérir le fer dans ces conditions (Stacy, et al., 2016 ; Ganz et Nemeth, 2015). Les plantes aussi, de leur côté, produisent des protéines aux diverses fonctions de stockage, de transport du fer, limitant l'accès du fer aux agents pathogènes. Le mécanisme de l'hôte visant à prévenir l'envahisseur de se procurer du fer est appelé immunité nutritionnelle. Cependant, les agents pathogènes ont mis en place des stratégies pour contourner cette rétention du fer par l'hôte.

Les méthodes d'acquisition du fer par les bactéries peuvent-être classées en deux groupes ; à savoir les systèmes d'acquisition directe (*i.e.* les bactéries ont des récepteurs pour les protéines de l'hôte ou les dérivés de l'hémoglobine) et les systèmes d'acquisition indirecte.

1.7 Systèmes de transport du fer chez les microorganismes

Dans les conditions appauvris en fer ou chez l'hôte mammifère/plante, les bactéries utilisent deux principaux mécanismes pour subtiliser le fer à leurs hôtes : il s'agit du transport direct et du transport indirect. Le transport direct fait intervenir des récepteurs spécifiques chez les bactéries qui vont arracher directement le fer des protéines de l'hôte, alors que dans le transport indirect, les bactéries sécrètent des molécules de petits poids moléculaires, appelés sidérophores, qui vont aller dans l'environnement, chercher le fer en circulation libre et le ramener aux bactéries.

1.8 Transport à partir des sidérophores

Les systèmes d'acquisition indirects font appel à des molécules de faibles poids moléculaires (<1000 Da) appelées sidérophores (SID). Elles sont produites et sécrétées par des bactéries, des champignons et certaines plantes (dans un environnement pauvre en fer) et caractérisées par une très grande spécificité et affinité envers les ions ferriques (Fe^{3+}), (Zheng et Nolan, 2012 ; Braun et Hantke, 2011). Il existe plusieurs types de SID bactériens, comme rapportés dans la littérature scientifique ; cependant, ils peuvent être classés en trois grandes classes : les catécholates-phénolates, les hydroxamates et les acides hydroxycarboxyliques (Hider et Kong, 2010). Il faut noter que beaucoup de bactéries ont des systèmes de transport et d'utilisation de SID produits par d'autres organismes (xénosidérophores) dans leur environnement. Une fois que le complexe SID- Fe^{3+} s'est rendu à l'intérieur de la bactérie, la forme ferrique (Fe^{3+}) du fer est réduite en sa forme ferreuse (Fe^{2+}), puis libérée du sidérophore qui va être recyclé pour ramener plus de fer à la bactérie. Ce processus fait appel au transport actif, et donc de l'énergie. Du fait des différences structurales membranaires des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, celles-ci ont des mécanismes différents d'acquisition du fer par les sidérophores.

1.8.1 Transport à partir des SID chez les bactéries à Gram négatif

Escherichia coli est l'organisme modèle chez les bactéries à Gram négatif pour l'étude de plusieurs processus biologiques, notamment le transport à travers la paroi. Le transport du fer de l'environnement jusqu'au cytoplasme des bactéries à Gram négatif s'effectue en plusieurs étapes : la reconnaissance par un récepteur situé sur la membrane externe du complexe SID-Fe³⁺, le transfert du complexe vers le périplasme, la présentation du complexe à la membrane cytoplasmique, la translocation du complexe dans le cytoplasme et la réduction de la forme ferrique du fer et la libération du SID et de son recyclage (toutes ces étapes sont représentées dans la fig. 4).

1.8.1.1 Reconnaissance du complexe SID-Fe³⁺ par un récepteur de la membrane externe

Les SID sécrétés par la bactérie vont chélater le fer se trouvant dans l'environnement. Le complexe SID-Fe³⁺ formé est alors identifié par les protéines spécifiques (récepteurs) à ce complexe se trouvant à la membrane externe. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires connues sous le nom de porines, qui forment de canaux ou pores, laissant rentrer de petits solutés de nature hydrophile. Plusieurs de ces récepteurs ont été identifiés chez *E. coli*, dont FecA, FhuA, FhuE, Fiu, FepA et Cir. Une fois que le récepteur se lie au ligand (SID-Fe³⁺), il se produit alors des changements de conformation au niveau du récepteur qui va permettre la translocation du complexe de l'environnement extérieur vers le périplasme. Il a aussi été proposé que chez certaines bactéries à Gram négatif, des apo-SID (SID sans fer) sécrétés peuvent se lier au récepteur membranaire dans l'attente de se voir transféré le fer complexé à un holo-SID (SID lié au fer). L'apo-SID ayant reçu le fer est alors transloqué dans le périplasme (Raymond, et al., 2015).

1.8.1.2 Transfert du complexe SID-Fe³⁺ vers le périplasma

Le transfert vers le périplasma du complexe SID-Fe³⁺ demande de l'énergie et celle-ci est fournie par le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD ; un système de transduction d'énergie de la membrane cytoplasmique jusqu'à la membrane externe des bactéries à Gram négatif. TonB interagit à la fois avec les composantes de la membrane cytoplasmique (ExbB-ExbD) et la membrane externe (récepteurs). TonB est constituée structuralement d'une petite portion hydrophobique dans son domaine transmembranaire N-terminal qui est associé aux protéines ExbB et ExbD, d'un domaine riche en proline, et finalement d'un domaine C-terminal qui interagit avec plusieurs transporteurs de la membrane externe (Runci et al., 2019). Un modèle d'hélice de TonB a été proposé dans lequel TonB reste associée à la membrane cytoplasmique, subissant un mouvement de rotation du domaine « hélicoïdal » C-terminal, mouvement initié au niveau de la membrane cytoplasmique par les protéines ExbB, ExbD et la force proton motrice. Le récepteur lié au ligand (SID-Fe³⁺) libère alors ce dernier pour sa translocation périplasmique lorsque l'hélice de TonB s'associe au tonneau du récepteur de la membrane externe, suite à l'initiation du mouvement de rotation au niveau de la membrane cytoplasmique (Postle et Kadner, 2003). *Acinetobacter baumannii* possède, dépendamment des souches, jusqu'à trois gènes *tonB* (*tonB1*, *tonB2* et *tonB3*) ; les trois gènes *tonB* n'ayant pas la même importance dans l'acquisition de la forme ferrique du fer dans les conditions appauvries en fer (Runci et al., 2019).

1.8.1.3 Présentation du complexe à la membrane cytoplasmique

Une fois transloqué dans le périplasma, le complexe SID-Fe³⁺ est pris en charge par les protéines d'association périplasmiques qui vont se charger de le transporter et le présenter aux perméases ABC (ATP Binding Cassette). Les perméases ABC sont retrouvées à la fois chez les bactéries à Gram négatif que positif. Trois protéines d'association périplasmiques ont été décrites chez *E. coli*, à savoir FhuD, FecB et FepB. Contrairement aux récepteurs de la

membrane externe, les protéines périplasmiques présentent moins de spécificité envers le sidérophore impliqué. Par exemple, FhuD chez *E. coli* se lie à divers sidérophores : ferrichrome, coprogène, l'acide rhodotorulique, ferrioxamine A, B et E, et aérobactine (Wandersman et Delepelaire, 2004).

1.8.1.4 Translocation du complexe dans le cytoplasme

Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), ainsi nommés parce qu'ils se servent de l'ATP comme source d'énergie pour le transport, sont composés de deux domaines transmembranaires (protéines intégrales membranaires) et de deux domaines de liaison aux nucléotides (protéines hydrophiles associées aux domaines transmembranaires) d'un côté de la membrane. Chez *E. coli*, les transporteurs ABC sont constitués de deux homodimères ; une paire de protéines identiques se retrouvant dans le cytoplasme, sur la surface interne de la membrane cytoplasmique et une autre paire de protéines identiques, appelées perméases. Trois sortes de transporteurs ABC spécialisées dans le transport des complexes ferriques sont retrouvées chez *E. coli* ; il s'agit de transporteurs FecCDE, FhuBC et FepCDG. Les domaines de liaison aux nucléotides hydrolysent l'ATP, et par conséquent entraînent un changement de conformation au niveau des domaines transmembranaires, permettant ainsi aux substrats de traverser la membrane cytoplasmique.

1.8.1.5 Réduction de la forme ferrique du fer et libération du SID et de son recyclage

Une fois rendu dans le cytoplasme, le complexe SID-Fe³⁺ est réduit par les enzymes ferrique-réductases ou des donneurs d'électrons intracellulaires en circulation libre. La réduction du complexe SID-Fe³⁺ entraîne la formation complexe SID-Fe²⁺ avec une plus faible affinité que celle du complexe SID-Fe³⁺, entraînant la dissociation et la libération de Fe²⁺ pour le rendre disponible pour l'usage bactérien. Le ferrique-réductase se conduit comme une réductase finale

de la chaîne de transport d'électrons, réductase liée à la membrane cytoplasmique. La réduction de l'ion ferrique est associée à la génération de la force proton motrice à travers la membrane cytoplasmique, qui est ainsi utilisée pour produire l'ATP par l'ATP synthase, ancrée dans la membrane, pour promouvoir l'acquisition de nutriments ou encourager le mouvement. Une fois que l'ion ferreux Fe^{2+} est libéré du complexe, le SID est recyclé (Hannauer, et al., 2010). Parallèlement au transport indirect, un autre système de transport du fer est spécifique aux bactéries à Gram négatif ; ce système de transport implique les hémophores. Les hémophores sont des protéines bactériennes sécrétées dans l'environnement qui vont séquestrer l'hème de diverses hémoprotéines. Les bactéries ont cette capacité d'internaliser l'hème en entier et le dégrader dans le cytosol afin d'en extraire le fer. Beaucoup d'espèces bactériennes sont capables de directement reconnaître et d'internaliser, à travers des protéines spécifiques à leur surface, l'hème exogène ou les hémoprotéines de l'hôte. Les hémophores ont été identifiés chez *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia pestis* et *Yersinia enterocolitica* (Wandersman et Delepelaire, 2004). D'autres bactéries à Gram négatif sécrètent des protéines (e.g. HasA de *Serratia marcescens* ou HxuA de *Haemophilus influenza*), capables d'acquérir l'hème à partir de diverses sources et de le transporter jusqu'aux récepteurs spécifiques situés sur la membrane externe (Runyen-janecky, et al., 2013). Une fois reconnu par le récepteur, l'hème est alors internalisé avec l'aide du complexe protéique TonB-ExbB-ExbD (Cescau et al., 2007).

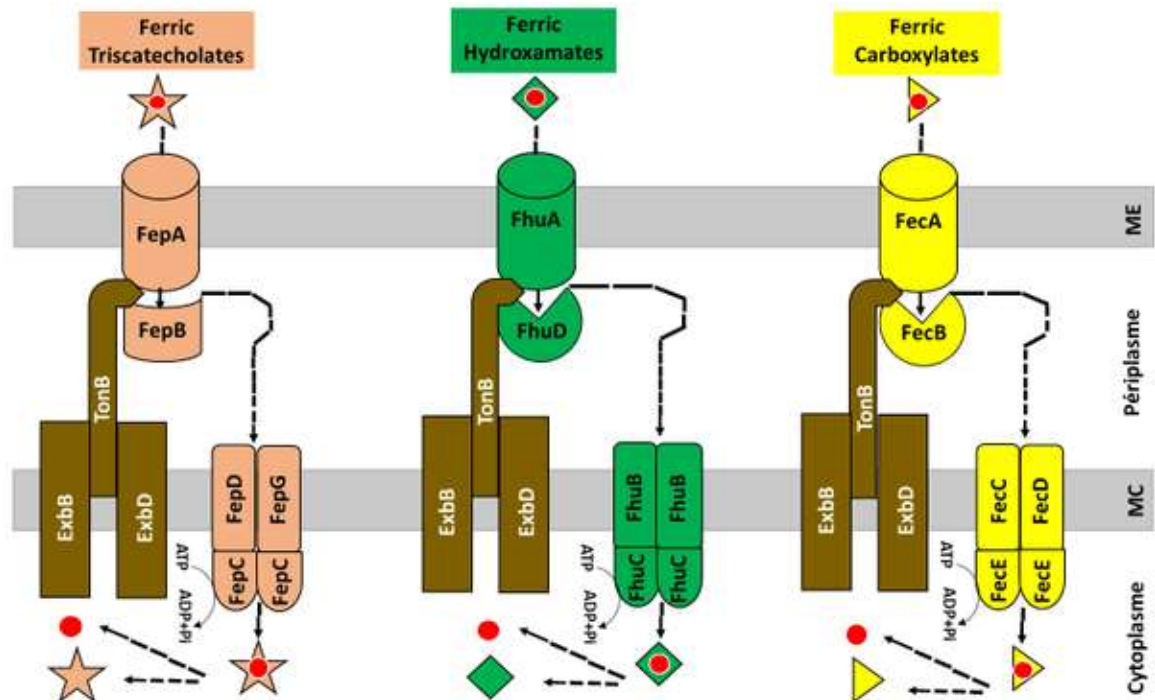


Figure 4: Systèmes de transport du fer indirect par les sidérophores chez les bactéries à Gram négatif, e.g. *E. coli* (Inspiré de Miethke, 2013).. ME : membrane externe ; MC : membrane cytoplasmique

1.8.2 Transport à partir des SID chez les bactéries à Gram positif

Contrairement aux bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif ont une structure membranaire différente, ne possédant ni périplasma, ni membrane externe. Les systèmes de transport et d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram positif diffèrent donc de ceux des bactéries à Gram négatif. Le point commun entre les groupes bactériens est que, dans les conditions appauvries en fer, les deux groupes produisent les SID. Les bactéries à Gram positif produisent des récepteurs de SID à leurs membranes cytoplasmiques ; ces récepteurs sont des transporteurs ABC à l'image de ceux rencontrés chez les bactéries à Gram négatif. *E. coli* est le prototype pour l'étude moléculaire des phénomènes chez les bactéries à Gram négatif ; son

parallèle chez les bactéries pathogènes à Gram positif est *Staphylococcus aureus*. Dans les conditions pauvres en fer, *S. aureus* met en place ses systèmes de transport du fer. *S. aureus* produit principalement des SID de type carboxylate (Staphyloferrines) ; cependant, il a tout un mécanisme en place pour l'utilisation des xénosidérophores d'autres classes (hydroxamates et catecholates), ce qui lui donne un avantage compétitif sur les autres bactéries dans son environnement. Le système de transport du fer chez *S. aureus* est composé d'un récepteur ancré dans la membrane cytoplasmique, d'une perméase et d'une ATPase. Toutes ces composantes jouant des rôles similaires à ceux décrits chez les bactéries à Gram négatif (Maresso et Schneewind, 2006). De plus, à l'image des bactéries à Gram négatif, certaines bactéries à Gram positif sont également capables d'extraire et d'utiliser l'hème provenant des hôtes mammifères (Conroy, et al., 2019).

1.8.3 Transport à partir des protéines de l'hôte

Comme mentionné plus haut, l'hôte mammifère sécrète beaucoup de protéines telles que la lactoferrine (Lf) et la transferrine (Tf) qui chélatent le fer et le rendent inaccessible aux agents pathogènes. Chez les bactéries agents pathogènes à Gram négatif, l'acquisition du fer directement de la lactoferrine et de la transferrine est d'une grande importance ; pour ce faire, les agents pathogènes tels que *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* possèdent des récepteurs spécifiques à ces protéines à leurs membranes. Les récepteurs Tf et Lf chez les bactéries à Gram négatif sont constitués chacun de deux protéines, à savoir la TbpA et TbpB et de LbpA et LbpB, respectivement ; TbpA et TbpB sont capables de se lier de manière indépendante à la Tf. Cependant, TbpB a une préférence de liaison avec la ferri-transferrine, alors que TbpA peut se lier à la fois, avec une même affinité, à la ferri-transferrine ainsi qu'à l'apotransferrine (sans fer). Le récepteur Tf bactérien est composé du transporteur dépendant de TonB, TbpA. Cependant, les mécanismes d'extraction et d'utilisation du fer contenu dans la Tf et la Lf par les agents pathogènes en utilisant l'énergie provenant de TonB restent à être élucidés (Morgenthau, et al., 2013). De plus, avec des poids

moléculaires largement supérieurs à ceux des sidérophores, ce serait inimaginable de s'attendre à voir la Lf ou la Tf passer à travers les récepteurs membranaires des bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif sont également capables d'arracher le fer de la Tf, mais ces mécanismes d'acquisition du fer sont moins bien caractérisés (Wandersman et Delepelaire, 2004).

Outre l'acquisition directe (hémophores) du fer ou indirecte (sidérophores) par les bactéries, dans les conditions anaérobiques ou à plus bas pH, les réductases ferriques réduisent la forme ferrique Fe^{3+} du fer en forme ferreuse Fe^{2+} , plus soluble et qui peut diffuser à travers les porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Lau, Krewulak, et Vogel, 2016). Il y a plusieurs systèmes de transport ferreux bactériens qui ont été décrits dans la littérature, dont le plus étudié est le FeoABC (ferrous iron importer). Le système Feo existe également chez les bactéries à Gram positif ; cependant, il est très peu caractérisé chez ce groupe.

1.9 Régulation et homéostasie du fer

L'aptitude au maintien de l'équilibre du milieu intérieur par un organisme, indépendamment des contraintes extérieures, est appelée homéostasie. L'excès ou l'insuffisance du fer pouvant causer des dommages aux bactéries dépendantes de ce métal pour leur bon fonctionnement, celles-ci déploient des stratégies adaptées pour maintenir le niveau du fer intracellulaire à un niveau optimal. L'excès du fer dans les conditions aérobiques provoquent la production en plus grande quantité de substances très toxiques pour les bactéries, notamment par la génération des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et de radicaux hautement réactifs tels que le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), découlant de la réaction de Fenton (Andrews et al., 2003; Cornelis, et al, 2011). Cependant, les bactéries sont équipées de mécanismes appropriés pour combattre les effets néfastes de ces radicaux, en produisant des enzymes de détoxification (antioxydants) telles que les superoxyde dismutases (SOD), la catalase et la peroxidase.

Le maintien de l'homéostasie du fer intracellulaire est régulé par l'un des acteurs les plus importants, à savoir la protéine Fur (ferric-uptake regulator), qui est retrouvée autant chez les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif. Fur est une protéine homodimérique composée de sous-unités de 17-kDa (Coy et Neilands, 1991). Chez *E. coli*, plus de 90 gènes sont régulés par le fer et Fur (Hantke, 2001). Fur sert principalement de répresseur des gènes impliqués dans les systèmes de transport du fer, c'est-à-dire les gènes de la biosynthèse et du transport des SID à travers la/les membrane(s) ; elle réprime la transcription de ces gènes une fois qu'elle se lie à son corépresseur, le Fe^{2+} . Cette répression est cependant inactivée en absence du Fe^{2+} (fig. 5). *In vitro*, il a été démontré que Fur peut lier, en plus du fer, d'autres métaux comme Co^{2+} et Mn^{2+} (Bagg et Neilands, 1987). De plus, toujours chez *E. coli*, Fur contient au moins un ion Zn^{2+} par dimer (Althaus, et al., 1999). Cependant, cette structure n'est pas conservée chez toutes les bactéries. Une séquence consensus palindromique appelée boîte Fur se trouve être le site de liaison du complexe Fur- Fe^{2+} . Le complexe Fur- Fe^{2+} se lie aux promoteurs des gènes impliqués dans les systèmes de transport du fer (y compris Fur), entre les sites -35 et -10. Cette liaison empêcherait donc l'ARN polymérase de venir se lier au promoteur et initier la transcription des gènes situés en amont du promoteur. La séquence consensus reconnue par Fur est la suivante :

GATAATGAT(A/T) ATCATTATC

Il faut cependant noter que cette exacte séquence n'est retrouvée nulle part dans le génome d'*E. coli* et les sites de liaison avec Fur ne contiennent qu'entre 11 et 19 bases de la séquence consensus (Newman et Shapiro, 1999). La caractérisation de la protéine Fur d'*E. coli* donne des indications comme quoi sa région N-terminale serait nécessaire pour son interaction avec l'ADN, alors que son domaine C-terminal serait suffisant pour sa liaison aux ions métaux (Coy et Neilands, 1991). Quoi que Fur soit très importante dans l'homéostasie du fer chez les bactéries, elle n'est pas la seule protéine qui joue ce rôle. En effet, par exemple, certaines bactéries à Gram positif (*Corynebacterium spp.* ; *Mycobacterium tuberculosis*), ayant des taux élevés en GC, ont tendance à utiliser d'autres protéines (DtxR chez *Corynebacterium spp* et IdeR chez *Mtb*) pour contrôler le niveau du fer intracellulaire (Lee et Helmann, 2007). De plus,

chez une autre bactérie à Gram positif, en l'occurrence, *B. subtilis*, il existe des orthologues de Fur (Zur et PerR) qui jouent le rôle de régulateur du fer chez cet organisme (Lee et Helmann, 2007).

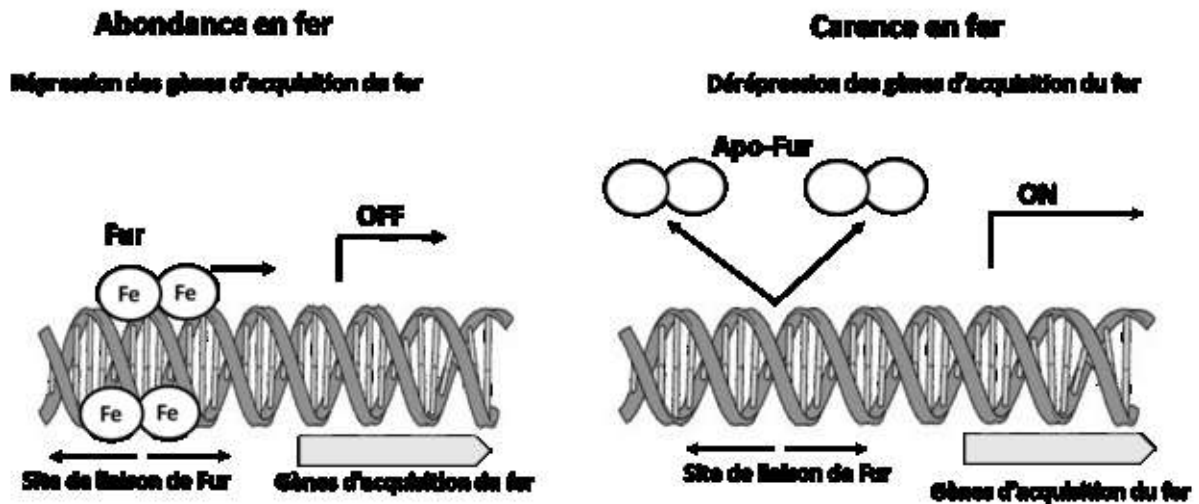


Figure 5: Schéma représentatif de la répression médiée par Fur (Figure modifiée de Andrews et al., 2003). Fur: *Ferric-uptake regulator*; Fe: Fer; Apo-Fur: Fur sans fer.

De plus, Fur-Fe²⁺ agit comme un répresseur de la transcription du petit ARN RyhB qui a comme fonction, de déstabiliser l'ARNm pour les protéines de stockage de fer ; jouant ainsi indirectement un rôle de régulateur positif (Cornelis et al., 2011). Dans un milieu déplété en fer, ou soit chez un mutant *fur*, l'expression de RyhB est dérèprimée, causant ainsi le déclin du niveau des ARNm cibles (Jacques et al., 2006). La fig. 6 est une représentation de l'interaction entre Fur et RyhB.

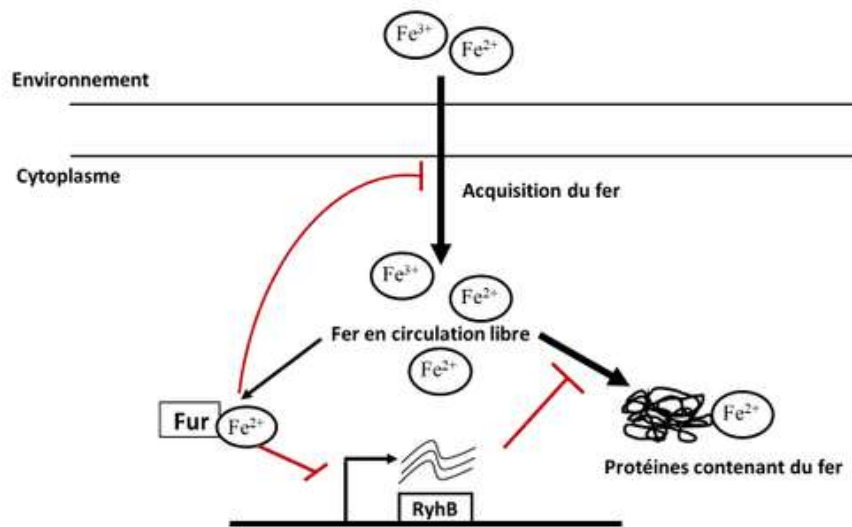


Figure 6: Schéma représentant la modulation par RyhB du fer libre intracellulaire (Jacques et al., 2006)

1.10 Systèmes de transport du fer chez *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii fait partie du groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp). Les bactéries du groupe ESKAPE sont multirésistantes et très virulentes, responsables de la majorité d'infections nosocomiales (Rice, 2008). L'agence américaine CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*) a classé *A. baumannii* comme une « menace sérieuse » dans son rapport de 2013, car même si cette espèce bactérienne ne représente qu'environ 2% des infections nosocomiales, il n'en demeure pas moins que 63% de ces isolats sont multi-résistants, rendant ainsi son traitement plus que problématique (CDC, 2013). Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes utilisés par la bactérie pour infecter son hôte.

Beaucoup d'espèces d'*Acinetobacter* arrivent à établir diverses infections chez l'hôte mammifère malgré le fait que l'accès aux nutriments, dont le fer, est très limité. Cette capacité d'*Acinetobacter* à établir l'infection est le résultat de son aptitude à mettre en place de mécanismes très élaborés pour l'acquisition de ces nutriments. Comme mentionné ci-haut, pour faire face l'insuffisance du fer chez l'hôte, les agents pathogènes déploient le gène *fur* qui régule l'expression des gènes responsables de l'acquisition du fer, en se liant à la séquence d'ADN conservée de la boîte Fur se trouvant dans la région en amont de ces gènes. La présence de Fur a été mise en évidence chez la souche d'*A. baumannii* BM2580, et montre une identité à 63% à celle (Fur) d'*E. coli* (Daniel, et al., 1999). Il est à noter que BM2580 n'est pas la seule souche d'*A. baumannii* chez laquelle on retrouve la protéine Fur ; celle-ci est également retrouvée chez les souches ATCC 19606^T et ATCC 17978 (Eijkelkamp, et al., 2011a; Mihara et al., 2004a). Les souches d'*A. baumannii*, peuvent produire jusqu'à trois SID : acinétobactine (Acb), baumannoferrine et fimsbactine (Bohac, et al., 2019). Acb a été caractérisée comme un facteur de virulence dans le modèle d'infection de la souris (Gaddy et al., 2012). Quoique la production de baumannoferrine et Acb soit très bien conservée chez les isolats cliniques, celle de la fimsbactine (Fim) n'est pas beaucoup répandue (Bohac et al., 2019). À date, Fim a été mise en évidence chez deux souches d'*Acinetobacter*, à savoir *A. baumannii* ATCC 17978 et *A. baylyi* ADP1 (Proschak et al., 2013a). Cependant, de manière surprenante, l'étude génomique sur *A. baumannii* SDF (ainsi nommé parce qu'isolée de poux chez les Sans Domicile Fixe en France) a révélé que celle-ci ne contient pas de gènes liés à la production de SID (Vallenet et al., 2008) . Quelques études ont suggéré que cette souche n'a pas besoin de produire des SID puisqu'en vivant dans les intestins des organismes hématophages, celle-ci aurait un accès direct soit à l'hème ou soit à l'hémoglobine et donc aux cellules sanguines contenant suffisamment du fer (Houhamdi et Raoult, 2006). Des gènes ayant un lien avec la production de l'héماغglutinine/hémolysine et pouvant agréger les érythrocytes , détruire leur membrane et libérant l'hémoglobine, ainsi que ceux liés à la production du complexe TonB-ExbB-ExbD ont aussi été identifiés chez la souche SDF (Vallenet et al., 2008). En revanche, *A. baumannii* ne possède pas de caractéristiques génétiques codant pour les protéines pouvant

lier les protéines telles que la transferrine et la lactoferrine, permettant l'acquisition du fer (Smith, et al., 2007) .

Des trois SID rencontrés chez *A. baumannii*, le mieux caractérisé est l'Acb. Acb est un SID mixte contenant un cycle oxazoline, dérivé de la thréonine (McConnell, et al., 2013). La structure moléculaire d' Acb est très similaire à celle d'anguibactine, un SID ayant une grande affinité avec les ions ferriques et mis en évidence chez le pathogène de poisson, *Vibrio anguillarum* 774 (Dorsey et al., 2004; Mihara et al., 2004b). L'anguibactine possède un groupement thiazoline dérivant de la cystéine (fig. 7). Cependant, malgré cette petite différence structurale et le fait que ces deux SID soient retrouvés chez deux bactéries n'ayant pas de lien et se retrouvant dans deux environnements différents, ils sont fonctionnellement très proches.

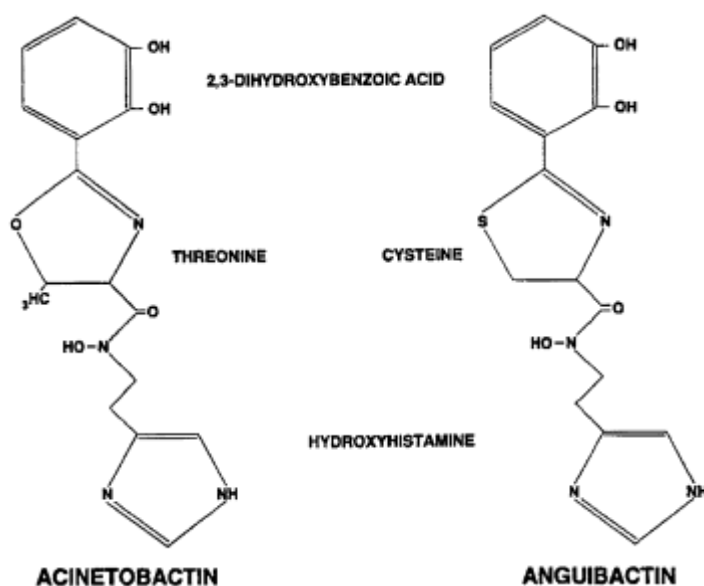


Figure 7: Structures moléculaires d'Acb (gauche) d'*A. baumannii* ATCC 19606 et d'anguibactine (droite) de *Vibrio anguillarum* 774 (Dorsey et al., 2004).

La biosynthèse d' Acb est faite à partir des précurseurs suivants : 2,3- acide dihydroxybenzoïque (DHBA), hydroxyhistamine et de la thréonine, grâce aux protéines codées par le groupe de gènes de synthèse et du transport d' Acb, retrouvés chez les différentes

souches cliniques d'*A. baumannii* (Eijkelkamp et al., 2011a; Hasan, et al., 2015). Chez la souche ATCC 19606, le système d'acquisition du fer dépendant d'Acb est composé de trois systèmes putatifs se situant dans le même cluster. La carte génétique (fig. 8) révèle que les gènes suivants sont impliqués dans la biosynthèse d'Acb : *basA*, *basB*, *basC*, *basD*, *basF*, *basG*, *basH*, *basI* et *basJ* (Zimbler et al., 2009). La sécrétion de l'Acb produite est assurée par les protéines codées par les gènes *barA* et *barB*, appartenant à la superfamille ABC, et responsables du système d'efflux de SID chez *A. baumannii* (Penwell, et al., 2012a). Pour internaliser le complexe ferrique-Acb, *A. baumannii* utilise un système de récepteur spécifique composé de protéines codées par les gènes *bauA*, *bauB*, *bauC*, *bauD*, *bauE* et *bauF* (Zimbler et al., 2009). Par ailleurs, il faut noter que les protéines BauB, BauC, BauD et BauE jouent un rôle très important dans la translocation des complexes ferrique-Acb vers l'intérieur des cellules bactériennes (Eijkelkamp, et al., 2011b).



Figure 8: Carte physique du cluster de gènes de production et d'utilisation d'Acb chez *A. baumannii* ATCC 19606 (Hasan et al., 2015).

Les gènes *basF* et *basJ* qui sont retrouvés dans le cluster régulé par Fur et respectivement homologues de *entC* et *entB* d'*E. coli*, sont nécessaires pour la production de DHBA. Cependant, il est à noter que chez *A. baumannii*, le gène *entA* est retrouvé dans une région autre que celle contenant le cluster de gènes codant pour la production et le transport d'Acb (Mihara et al., 2004a; Penwell, et al., 2012b). La protéine EntA est indispensable chez *A. baumannii* pour la production de DHBA et l'acquisition du fer (Penwell et al., 2012b). La

fonction putative du système de transport *bauABCDEF* chez *A. baumannii* a été mise en évidence, utilisant des mutants *bauA* et *bauD*, capables de produire Acb. Il faut noter que les mutants ainsi obtenus n'étaient pas en mesure de pousser dans les conditions où les ions ferriques ou le complexe ferrique-transferrine étaient les seules sources de fer (Dorsey et al., 2004b; Mihara et al., 2004a). En outre, une récente étude a démontré que contrairement aux précédentes connaissances (Shapiro et Wencewicz, 2016) faisant mention de l'utilisation d'Acb par *A. baumannii*, celle-ci ne serait même pas reconnue par le récepteur BauA, ce serait plutôt son isomère, la pré-Acb qui serait reconnue par le récepteur (Moynié et al., 2018). Il a été cependant précédemment suggéré que l'affinité de BauA pour pré-Acb et Acb serait dépendante du pH du milieu. Dans les conditions acidiqes, BauA aurait une meilleure affinité avec pré-Acb, alors que dans les conditions basiques ou à pH neutre, l'affinité de BauA serait meilleure avec Acb (Shapiro et Wencewicz, 2016). Le modèle expliquant ces différentes affinités de BauA envers les deux isomères a été proposé et le voici dans la fig. 9 ci-dessous :

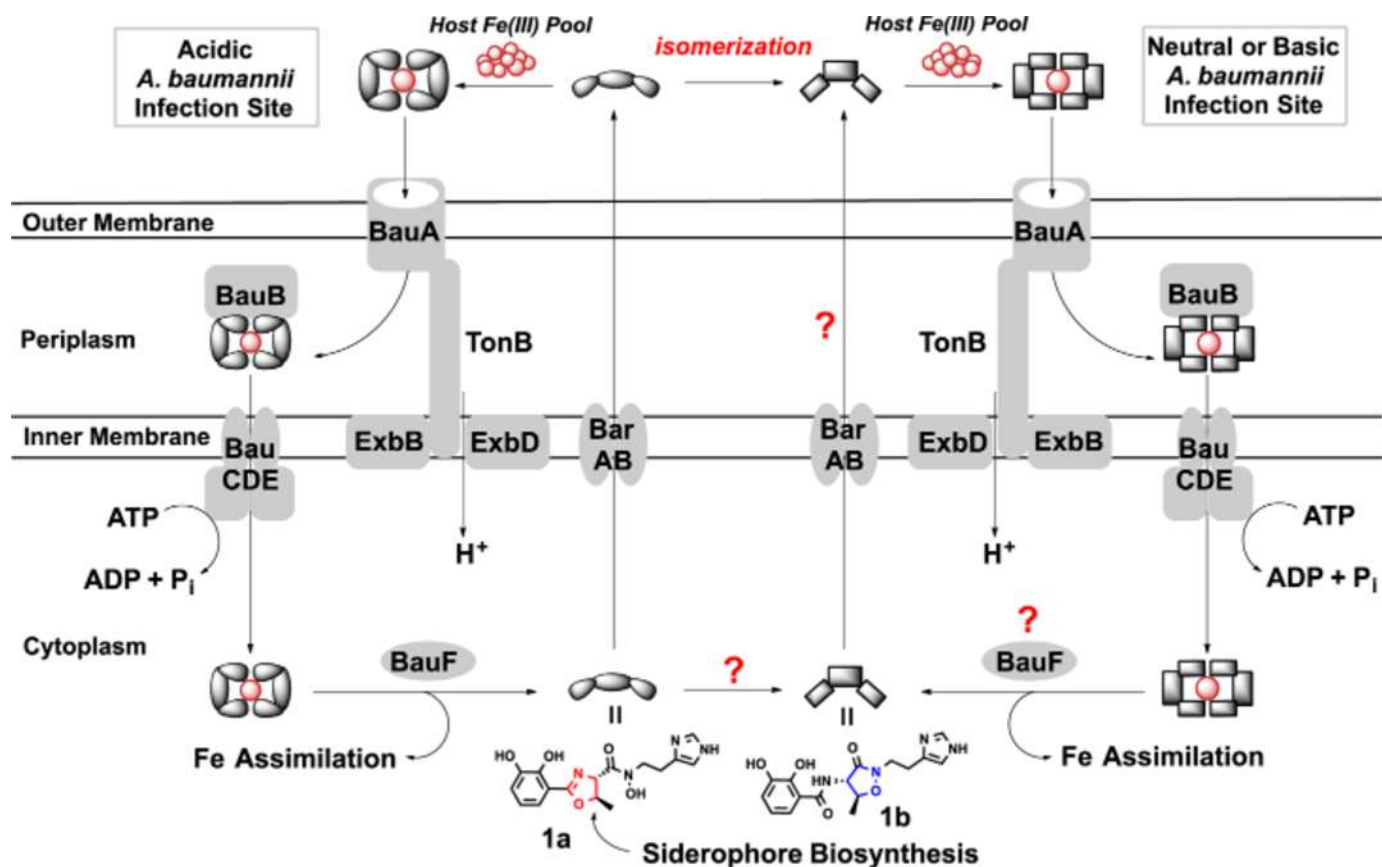


Figure 9: Affinités dépendantes du pH de BauA pour pré- Acb et Acb (Shapiro et Wencewicz, 2016)

Comme mentionné plus haut, en plus de l'Acb, qui a été extensivement caractérisée, et de la baumannoferrine, un nouveau SID mixte catécholate/hydroxamate, la Fim, a été mise en évidence chez *A. baumannii* ATCC 17978 et *A. baylyi* ADP1 (Proschak et al., 2013a). Structuralement, pré-Acb, Acb et Fim sont très similaires, car les trois possédant des groupements fonctionnels chélatant le fer, composés de catécholates et d'hydroxamates. Baumannoferrine est par contre structuralement différente des trois autres SID, car composée de citrate, de 1,3-diaminopropane, de 2,4-diaminobutyrate, d'acide décanoïque et d' α -kétoglutarate (Penwell et al., 2015). Ces similarités expliqueraient en partie le fait que les gènes de production et d'utilisation d'Acb soient conservés à travers les génomes d'isolats cliniques d'*A. baumannii*, alors que ceux de la Fim soient rares (Bohac et al., 2019). Il a par ailleurs été

démontré par l'équipe de Bohac et al., (2019) que l'opéron de la biosynthèse de Fim contient plusieurs gènes, dont celui codant pour une pompe à efflux FbsOQ, un récepteur membranaire dépendant de TonB, FbsN et une réductase putative FbsP. À cause de la présence d'une séquence signal N-terminale, la réductase FbsP a été prédite comme étant sécrétée dans le périplasme, car cette séquence est similaire à celle de la réductase FpvC interagissant avec le SID chez *P. aeruginosa* (Bohac et al., 2019; Ganne et al., 2017). D'autre part, Bohac et al., (2019) ont proposé que Fim serait exportée par FbsOQ et que le complexe Fim-Fe³⁺ serait probablement importé dans le périplasme par le récepteur dépendant de TonB, FbsN. Une fois dans le périplasme, FbsP réduirait le complexe et libérerait le Fe²⁺ qui serait alors importé dans le cytoplasme par le système de transport ferreux endogène FeoABC (Bohac et al., 2019) ; par conséquent, selon ces auteurs, l'apo-Fim (Fim sans fer) compétitionnerait avec Acb pour la liaison à la protéine périplasmique BauA, responsable du transport d'Acb. En proposant ce modèle (fig. 10), les auteurs ont admis qu'il est très similaire au système de transport de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* (Schalk et Guillon, 2013).

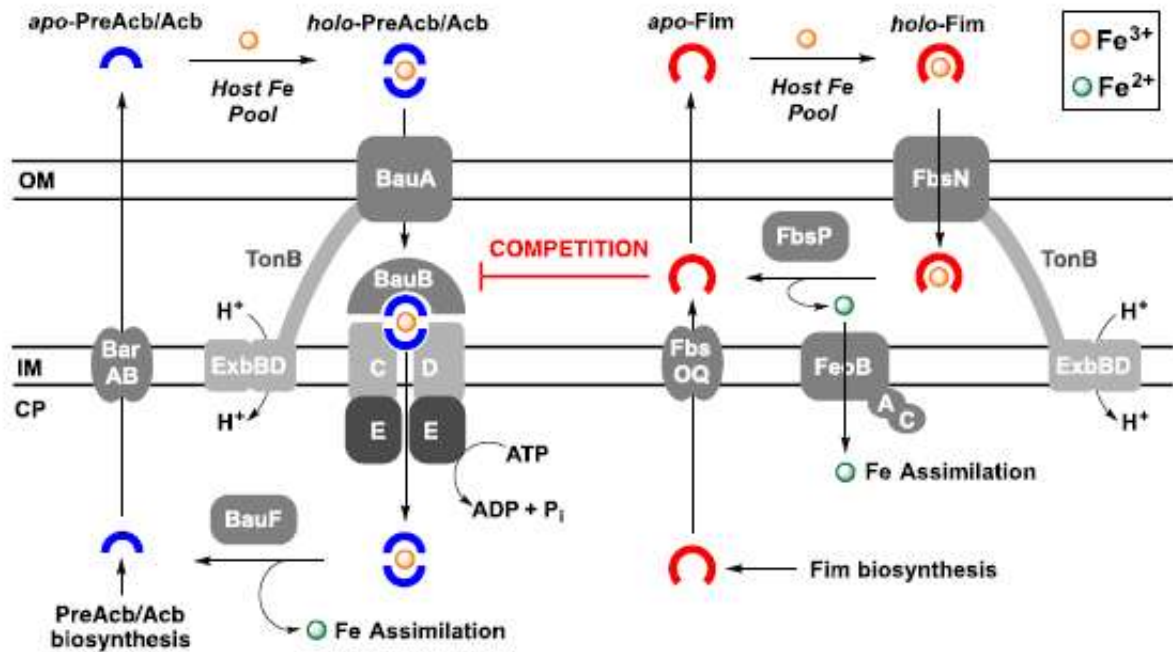


Figure 10: Modèle proposé montrant la compétition entre Fim et PreAcb/Acb pour la protéine périplasmique BauA (Bohac et al., 2019).

Comme pour tous les autres systèmes indirects d'acquisition du fer par les SID, ceux d'*A. baumannii*, dépendent également du transport actif grâce au système TonB-ExbB-ExbD. Comme mentionné dans la section 1.8.1. 2, *A. baumannii* possède jusqu'à trois systèmes TonB, très conservés chez tous les génomes séquencés. Par ailleurs, il a été suggéré que ces systèmes auraient probablement été acquis par des transferts horizontaux (Zimblér, et al., 2013). De plus, l'expression et la fonction de ces trois systèmes sont très hétérogènes, car seule TonB3 est surexprimée dans des conditions appauvries en fer, ce qui suggère que TonB3 serait impliquée dans l'homéostasie du fer. En outre, seules TonB2 et TonB3 pouvaient rétablir les fonctions TonB chez des mutants *tonB* chez *E. coli*. Des mutants *tonB1*, *tonB2* ainsi que *tonB1 tonB2* d'*A. baumannii* avaient de la difficulté à pousser dans des conditions pauvres en fer comparativement à la souche parente et sont moins aptes à transporter Acb et le fer. Il faut noter que les mêmes auteurs ont indiqué avoir été incapables de générer un mutant *tonB3*,

surlignant l'essentialité de ce gène pour la croissance (Zimbler et al., 2013). Cependant, un autre groupe a réussi à obtenir un mutant *tonB3* chez *A. baumannii* ATCC 19606 et a trouvé que *tonB3* est essentiel à la croissance de cette souche dans les conditions pauvres en fer, alors que les mutants *tonB1* et *tonB2* avaient une croissance similaire à celle du parent, et ce quelles que soit les conditions testées (Runci et al., 2019). Ces résultats sont contradictoires à ceux obtenus par Zimbler et al., (2013) qui ont observé de leur côté que les mutants *tonB* poussaient moins bien par rapport au parent dans un milieu M9 traité avec le bipyridyl, un chélateur de fer (Zimbler et al., 2013). Même si à date très peu de systèmes de production de SID ont été identifiés chez *A. baumannii*, il n'en demeure pas moins que cet organisme possède tout un système en place pour l'utilisation des SID produits par d'autres organismes présents dans son environnement, les xénosidérophores. Ceci lui donne sans aucun doute un avantage compétitif dans son environnement. *A. baumannii* utilise divers xénoSID, dont le desferricoprogène, l'acide rhodotolurique et la desferrioxamine B, et plusieurs récepteurs de xénoSID dépendant de TonB ont été identifiés chez cet organisme dont PiuA, PirA, FepA et FhuE (Subashchandrabose et al., 2016 ; Moynié, et al., 2017 ; Funahashi et al., 2012;). De plus, après analyse de sept génomes de souches d'*A. baumannii*, il a été observé que le nombre total de récepteurs de la membrane externe varie de 8 à 21 (Antunes, et al., 2011).

En plus du système d'acquisition de la forme ferrique (Fe^{3+}) du fer par les SID, *A. baumannii* possède également des systèmes pour se procurer la forme ferreuse (Fe^{2+}) ; ces systèmes sont représentés par FeoAB et son régulateur FeoC, ainsi qu'au moins une FeoB et FeoC qui sont retrouvés chez tous les génomes des souches séquencées (Antunes et al., 2011). Le rôle de FeoB dans la virulence d'*A. baumannii* a été examiné dans un essai de compétition entre le mutant *feoB* et le parent dans le modèle murin d'infection intraveineux (IV) et les résultats ont montré que le parent a pris le dessus dans la croissance 24h après infection au niveau des foies ainsi que des rates. Ainsi donc, FeoB contribuerait à la « fitness » d'*A. baumannii* pendant la bactériémie (Subashchandrabose et al., 2016). De même, les mutants *feoA* de la souche ATCC 17978 manquent de « fitness » dans le modèle murin d'infection pulmonaire comparativement au parent. Il a été également observé que ces mutants produisent moins de biofilm et adhèrent moins aux cellules eukaryotes, ce qui suggère que ce gène serait impliqué dans la virulence,

comme démontré par leur incapacité à infecter et tuer les larves de *Galleria mellonella* ainsi qu'à établir une infection dans le modèle pulmonaire de la souris (Álvarez-Fraga et al., 2018).

1.11 Systèmes de transport du fer comme cible thérapeutique

Le fer étant essentiel pour les agents pathogènes, ceux-ci mettent en place de mécanismes moléculaires très variés pour s'en procurer. De ce fait, ces composantes moléculaires constituent d'excellentes cibles thérapeutiques pouvant permettre de mieux gérer les infections causées par les bactéries agents pathogènes à Gram négatif, plus difficiles à traiter entre autres dû à de leur deuxième couche de membrane qui forme une barrière de perméabilité pour des composés d'une certaine taille. Pour se donner un avantage compétitif et prévenir le vol de leurs SID, certains agents pathogènes les produisant modifient ceux-ci en y attachant un antibiotique (ATB) de manière covalente. Ces conjugués naturels SID-ATB sont appelés sidéromyces. Le compétiteur possédant les systèmes de transport du xénoSID va donc internaliser le conjugué qui va tuer celui-ci en utilisant sa partie ATB.

1.12 Conjugués sidérophores-antibiotiques naturels : principe du cheval de Troie

Quelques conjugués SID-ATB produits par divers microorganismes ont été mis en évidence, et ce depuis plus de 60 ans. La sidéromycine naturelle la mieux caractérisée est l'albomycine, qui a été isolée de la bactérie à Gram positif, *Actinomyces subtropicus* (Gause, 1955). La structure chimique de l'albomycine est très similaire à celle du ferrichrome (fig. 11), un SID de type hydroxamate produit par les champignons du genre *Ustilago* (Ahmed et Holmström, 2014). Étant donné cette similarité de structures du ferrichrome et de l'albomycine, les microorganismes possédant les systèmes de transport du ferrichrome, y compris le récepteur membranaire FhuA, vont reconnaître l'albomycine et donc l'internaliser (Braun et al., 2009). Même si *E. coli* ne produit ni le ferrichrome, ni l'albomycine, elle possède les systèmes de

transport pour ces deux molécules ; ces systèmes sont composés du récepteur FhuA, de la protéine périplasmique FhuD, de la protéine de la membrane cytoplasmique FhuB et de l'ATPase FhuC qui fournit l'énergie nécessaire pour le transport à travers la membrane. Une fois que l'albomycine est internalisée, la partie antibiotique est clivée du SID-Fe³⁺ par la peptidase N, codée par le gène *pepN*. Il est à noter que les mutants *pepN* sont résistants à l'albomycine ; ce qui suggère que la libération de la partie antibiotique est indispensable pour son activité (Braun et al., 1983).

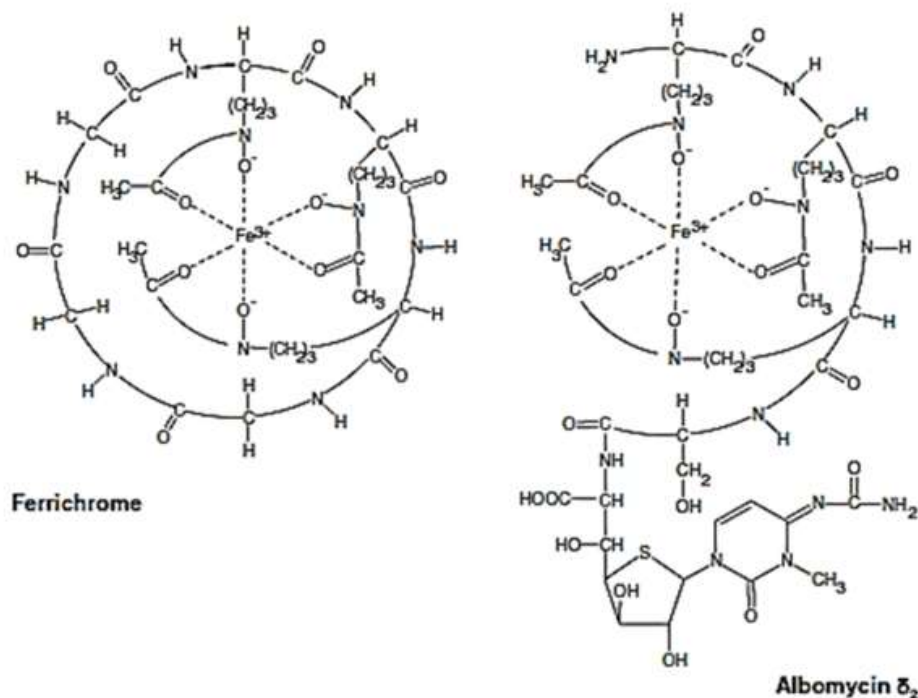


Figure 11: Schéma représentant les structures du ferrichrome (gauche) et de l'albomycine (droite) (Braun et al., 2009)

Un autre conjugué naturel SID-ATB est la salmycine, produite par la bactérie à Gram positif, *Streptomyces violaceus* (Rivera, et al., 2018; Vértesy, et al., 1995). La salmycine est un dérivé de la ferrioxamine conjuguée à un aminodisaccharide. Son mécanisme d'action serait

probablement l'inhibition de la synthèse protéique. Les salmycines sont efficaces typiquement contre les bactéries à Gram positif, à l'exception de la salmycine A qui est également active contre *K. pneumoniae*, une bactérie à Gram négatif. Ceci est en contraste avec les albomycines, actives contre les bactéries aussi bien à Gram positif que négatif. Les agents pathogènes *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* ont été utilisés pour étudier le mécanisme d'internalisation des salmycines (Braun et al., 2009). De manière comparable aux albomycines, les salmycines semblent utiliser les systèmes de transport des hydroxamates (Pramanik et Braun, 2006), composés de protéines mentionnées ci-haut. De plus, comparativement à l'albomycine, les salmycines ont une activité beaucoup plus efficace contre les souches multirésistantes de *S. aureus* telles que celles résistantes à la méticilline (MRSA) (Wencewicz, et al., 2009). Une autre classe de sidéromycine est celle composée de ferrimycines (Sackmann, et al., 1962 ; Niesch et Kniisel, 1967), produites par la bactérie à Gram positif, *Streptomyces griseoflavus*. Les ferrimycines sont composées d'un groupement antibiotique actif et de la ferrioxamine B (Möllmann, et al., 2009). Il faut noter que tous les conjugués SID-ATB naturels mentionnés ici sont produits par les bactéries à Gram positif.

En plus des SID-ATB naturels produits par divers microorganismes, il existe également de conjugués appelés bactériocines, qui sont des toxines peptidiques, produites par les bactéries afin d'inhiber la croissance d'autres bactéries similaires se trouvant dans le même environnement (Chikindas et al., 2018). Il faut ajouter que les bactériocines, à l'image des conjugués SID-ATB, empruntent également les systèmes de transport du fer pour se faire internaliser (Rebuffat, 2012; White et al., 2017). Les bactéries à Gram négatif, y compris *E. coli*, produisent deux types de bactériocines, à savoir les colicines et les microcines. Il y a quelques différences entre les microcines et les colicines, notamment en taille : les microcines ont une plus petite taille (moins de 10 kDa), alors que les colicines ont une taille allant de 25 à 80 kDa, donc plus grandes que les microcines. De plus, contrairement aux colicines codées presque toujours par les gènes plasmidiques, les microcines sont codées par les gènes chromosomiques (Gillor et al., 2004; Rebuffat, 2012).

1.12.1 Conjugués sidérophores-antibiotiques : principe du cheval de Troie

Vu l'urgence de trouver de nouveaux agents thérapeutiques contre les bactéries multi-résistantes, surtout les bactéries agents pathogènes à Gram négatif qui sont plus difficiles à traiter à cause, en partie, de leur membrane externe, imperméable pour beaucoup d'antibiotiques ; les chercheurs ont synthétisé, en laboratoire, plusieurs conjugés SID-ATB qu'ils ont testé contre différents agents pathogènes, imprégnés de connaissances sur l'efficacité de conjugés SID-ATB naturels.

1.12.1.1 Revue sur les SID-ATB

Connaissant les mécanismes moléculaires d'acquisition de nutriments des bactéries agents pathogènes, l'on pourrait les utiliser afin de forcer les bactéries à internaliser des molécules de notre choix, toxiques contre celles-ci. C'est cette stratégie qui a été utilisée par les chercheurs en couplant les antibiotiques de manière covalente aux SID et cibler des bactéries spécifiques. Les β -lactamines sont des antibiotiques largement utilisés en clinique ; cependant, contre les bactéries à Gram négatif, leur efficacité reste faible. Les cibles des β -lactamines étant les PBP (*Penicillin Binding Proteins*), impliquées dans les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane, difficiles donc d'accès chez les bactéries à Gram négatif mais localisées de façon intéressante dans l'espace périplasmique. En conséquence, un grand nombre de conjugés SID-ATB ont été synthétisés en se servant de β -lactamines comme la moitié antibiotique de ces conjugés puisque seule la membrane externe doit être traversée pour rejoindre la cible de l'antibiotique (Brochu et al., 1992; Ghosh et al., 1996; Diarra et al., 1996). Il a été prouvé que ceux-ci utilisent effectivement les systèmes de transport du fer pour se rendre à l'intérieur de la bactérie. Brochu et collègues (1992) ont par exemple démontré que les mutants résistants d'*E. coli* X580 sélectionnés à partir du milieu contenant le conjugué JAM-2-263 (catécholate SID-carbacéphalosporine) ont perdu leur capacité d'expression du récepteur membranaire. Car alors que ceux résistants au conjugué EKD-3-88 (N5-acetyl-N5-

hydroxy-L-ornithine tripeptide hydroxamate SID-carbacéphalosporine) ont, quant à eux, perdu leur capacité d'expression du récepteur membranaire FhuA, récepteur des hydroxamates (Brochu et al., 1992). Du constat précédant, les conjugués contiennent une seule classe ou groupement fonctionnel de SID (p. ex. catécholate ou hydroxamate), ce qui favoriserait ainsi une sélection plus importante de mutants dans les systèmes de transport du fer. Le groupe du Professeur Marvin J. Miller (University of Notre Dame, IN, É-U) avait donc décidé de synthétiser des SID mixtes contenant à la fois les groupements catécholates et hydroxamates et les conjuguer aux ATB. La raison est que ces conjugués auraient plusieurs voies d'entrée dans les agents pathogènes cibles, avec donc des fréquences de mutations réduites. De plus, les mutants éventuellement obtenus seraient moins viables car ils auraient perdu plusieurs systèmes d'acquisition du fer et donc auraient de la peine à survivre dans un milieu déplété en fer ou chez l'hôte mammifère (Ghosh et al., 1996; Ghosh et Miller, 1996). Plusieurs autres groupes de recherche ont également synthétisé des conjugués SID- β -lactamines et ont démontré que ceux-ci ont de l'activité contre une variété d' agents pathogènes dont *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, entre autres (Heinisch et al., 2002; Möllmann et al., 2009; Wittmann et al., 2002; Erwin et al., 1991; Roosenberg II et al., 2000). De tous les conjugués SID- β -lactamines, celui qui a le plus avancé dans les essais cliniques est le Céfiderocol. Le Céfiderocol, anciennement connu sous le nom de S-649266 est un conjugué SID-céphalosporine qui a été synthétisé par la compagnie japonaise Shionogi. Le groupement fonctionnel du SID de ce conjugué est un catécholate (fig. 12) lié à la céphalosporine. Céfiderocol injectable a été testé en phase 2 clinique et s'est révélé très efficace contre les bactéries à Gram négatif, y compris les souches multi-résistantes de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae* (Hackel et al., 2017; Katsube et al., 2017; North, 2017; Portsmouth et al., 2018; Sato et al., 2017; Zhanel et al., 2019).

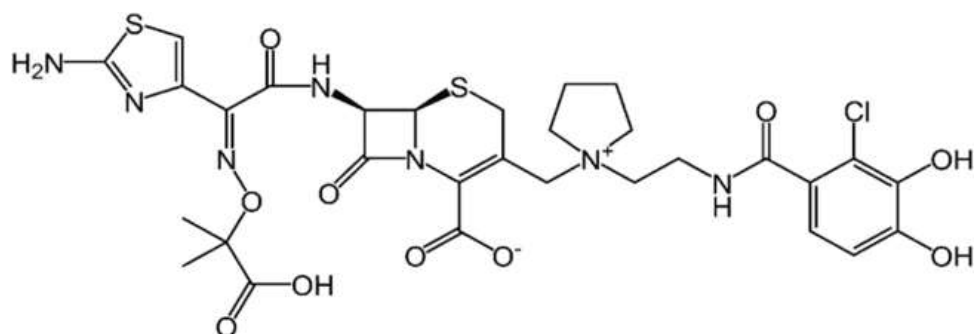


Figure 12: Structure chimique du céfiderocol (Katsube et al., 2017)

Un autre conjugué SID-β-lactamine en développement est MC-1, qui n'a cependant pas encore été évalué en clinique. MC-1 est un conjugué SID-monocarbam qui est très efficace *in vitro* contre une panoplie de bactéries pathogènes à Gram négatif (en particulier *P. aeruginosa* et *A. baumannii*), y compris les souches multi-résistantes ayant des modifications au niveau de leurs β-lactamases et porines (McPherson et al., 2012; Tillotson, 2016). Contrairement au MC-1 qui n'est pas encore en essai clinique, un autre conjugué, BAL30072 l'est. BAL30072 est un monosulfactam conjugué à une partie chélatrice du fer, le dihydroxypyridone, développé par la compagnie suisse Basilea Pharmaceutica. BAL30072. À l'image de MC-1, BAL30072 est également très actif contre un bon nombre de bactéries à Gram négatif d'intérêts cliniques (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae*), y compris les souches multi-résistantes (Page et al., 2010; Luscher et al., 2018; Mushtaq et al., 2009; Tillotson, 2016; Zgurskaya et al., 2016). Il faut ajouter que les récepteurs membranaires dépendant de TonB, PiuA et PirA chez *P. aeruginosa* et leurs orthologues chez *A. baumannii* sont responsables du transport actif des conjugués céfiderocol, MC-1 et BAL30072 (Ito et al., 2016; Luscher et al., 2018; McPherson et al., 2012; van Delden et al., 2013). Il faut noter que deux autres conjugués SID-β-lactamines, MB-1 (SID-monobactam) et SMC-3176 (SID-monocarbam), ont montré d'excellentes activités *in vitro* ; cependant, leur développement n'a pas été poursuivi à cause d'un manque de corrélation entre l'efficacité *in vitro* et celui *in vivo* d'une part, ainsi que de fréquences élevées de résistance, d'autre part (Ghazi et al., 2018; Tomaras et al., 2015).

Au-delà des β -lactamines qui ont été extensivement utilisées dans les synthèses de conjugués SID-ATB, d'autres classes d'ATB ont été également explorées ; c'est notamment le cas des fluoroquinolones (ATB à très large spectre). Plusieurs fluoroquinolones, y compris la ciprofloxacine, la norfloxacine et la N-desmethyl-ofloxacine ont été couplés à divers SID et leurs efficacités testées contre différents agents pathogènes. Le constat général dégagé après évaluation des conjugués SID-fluoroquinolones est que ceux-ci ne sont pas meilleurs en efficacité comparativement aux ATB seuls (Ji et Miller, 2012; Md-Saleh et al., 2009; Miller, et al., 2013; Milner et al., 2013; Noël et al., 2011). Par ailleurs, il est possible de conjuguer pas seulement un seul ATB mais deux à un SID ; c'est ce qu'a réalisé, de manière très fascinante, le groupe du Professeur Miller qui, a réussi à attacher un oxazolidinone à une céphalosporine, qui est ensuite conjuguée à un SID (bis-catécholate). Une fois que le conjugué est internalisé dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif, la partie céphalosporine est hydrolysée par l'ADC-1 β -lactamase, ce qui libère l'oxazolidinone qui peut alors se rendre dans le cytoplasme pour agir sur sa cible (inhibition de la synthèse protéique). Cette étude démontre que des ATB qui sont exclusivement efficaces contre les bactéries à Gram positif peuvent être réorientés, à l'aide du principe du cheval de Troie, pour usages contre les bactéries à Gram négatif (Liu et al., 2018; Schalk, 2018).

1.12.1.2 Sidérophores-antibiotiques synthétiques spécifiques contre *A. baumannii*

Même si les conjugués SID-ATB (céfiderocol, BAL30072, etc.) mentionnés ci-haut sont actifs contre *A. baumannii*, ceux-ci ne sont spécifiquement développés contre cet agent pathogène. Or, avec l'émergence et la dissémination de gènes de résistance entre différentes espèces bactériennes, il est plus que jamais très indispensable de développer des antibiothérapies très ciblées. Pour le cas d'*A. baumannii*, c'est le défi que s'est lancé le groupe de recherche du Professeur Miller, qui n'a pas tardé à cibler ce pathogène après qu'il a été aussitôt rapporté (Proschak et al., 2013a) la mise en évidence et l'élucidation de la structure d'un SID spécifique, la fimsbactine, à *A. baumannii*. Le premier conjugué synthétisé par le groupe de recherche

pour cibler *A. baumannii* fut un SID mixte biscatéchol-ate-mono-hydroxamate couplé à une carbacéphalosporine (fig. 13). La partie SID du conjugué est une réplique du SID naturel, fimsbactine, d'*A. baumannii*. Ce conjugué, que le groupe a nommé 1b, avait une activité sélective très importante contre *A. baumannii*, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0.0078 μM ; alors qu'il n'y avait pas d'activité observée contre les autres bactéries à Gram négatif testées ou contre *S. aureus*, indiquant que le conjugué utilise les systèmes de transport du fer spécifiques à *A. baumannii* pour exercer son activité (Wencewicz et Miller, 2013).

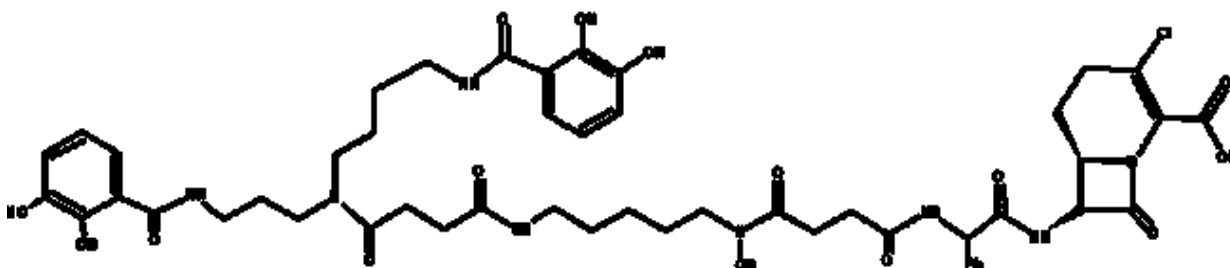


Figure 13: Structure du conjugué SID mixte-carbacéphalosporine (1b) (Wencewicz et Miller, 2013)

Il est indéniable que le composé 1b est très actif contre *A. baumannii*. Cependant, l'usage extensif des β -lactamines n'en fait pas une classe d'ATB de choix pour cibler les bactéries spécifiques ; étant donné que les phénomènes de multirésistance contre les β -lactamines sont très répandus. Par conséquent, il serait plus judicieux de choisir un antibiotique sans historique de résistance chez le pathogène ciblé. C'est dans cette optique que le même groupe (Miller et al.) a choisi comme ATB la daptomycine (DAP) pour le conjuguer au SID mixte, analogue de la fimsbactine, afin de cibler *A. baumannii*. La DAP est un antibiotique lipopeptidique produit par *Streptomyces roseosporus* et qui est utilisée pour le traitement des infections des bactéries à Gram positif. Son mécanisme d'action implique entre autres la formation de pores dans la membrane cytoplasmique, entraînant une fuite d'ions, ainsi que la dépolarisation et la perméabilisation de celle-ci (Müller et al., 2016; Taylor et Palmer, 2016). La DAP étant une

très grosse molécule (1619.70 g/mol) n'a aucune chance de traverser la membrane externe très sélective d'*A. baumannii* ; alors qu'en la couplant au SID, le conjugué, ainsi synthétisé pourrait utiliser les systèmes de transport du fer de la bactérie pour s'internaliser. Le conjugué SID-DAP s'est révélé très actif contre beaucoup de souches d'*A. baumannii*, y compris des souches multi-résistantes, alors que contre les autres espèces bactériennes testées, aucune activité n'a été observée. Le conjugué a même perdu de son activité contre *S. aureus* par rapport à la DAP seule (Ghosh et al., 2017). Ces résultats démontrent encore une fois qu'il est possible de cibler une espèce bactérienne de manière spécifique en utilisant ses systèmes d'acquisition de nutriments et ce, quelle que soit la taille de l'ATB. De plus, ces expériences démontrent également que des ATB qui ne sont efficaces contre les bactéries à Gram négatif, à cause de leur grosse taille ou une autre raison, pourraient être utilisés, conjugués aux SID pour cibler ce groupe de pathogène. Continuant sur cette lancée, le groupe de Miller a synthétisé plusieurs autres conjugués SID-DAP (fig. 14), se servant de différents SID (bis-catécholate, tris-catécholate et du mixte bis-catécholate+monohydroxamate) et les coupler à la DAP. Ces trois conjugués ont été testés contre différentes souches d'*A. baumannii*, y compris les souches multi-résistantes, productrices de carbapénemase et céphalosporinase, ainsi que d'autres espèces bactériennes. Les résultats indiquent que les trois conjugués sont très actifs contre les souches d'*A. baumannii* ; en outre, le SID mixte (analogue de la fimsbactine) conjugué à la DAP est le plus actif des trois conjugués contre les souches testées (Ghosh et al., 2018). Néanmoins, certaines souches (par ex : *A. baumannii* ARC 5081) n'étaient susceptibles ni au conjugué bis-catecholate-DAP, ni au tris-catécholate-DAP. Ces résultats indiquent clairement que les systèmes de transport du fer, spécifiques à *Acinetobacter*, ont été empruntés par le SID mixte-DAP pour initier son effet inhibiteur. En revanche, ces conjugués n'ont aucune activité contre les autres bactéries agents pathogènes à Gram négatif testées, à l'exception de *Salmonella typhimurium* *enb-7* qui était plus susceptible au conjugué SID mixte-DAP (CMI : 1.6 μ M) ; *S. typhimurium* *enb-7* est une souche qui ne produit pas le SID entérobactine, un tris-catécholate (Ghosh et al., 2018). En plus de la DAP qui a été conjuguée aux SID, le groupe a aussi synthétisé un autre conjugué, le bis-catécholate couplé à une céphalosporine, céphaclor (fig. 14, panel A). Pour conclure cette section, il faut noter qu'il existe, comme mentionné dans

la section précédente (§1.12.1.1), beaucoup de conjugués SID-ATB pour lesquels *A. baumannii* est susceptible. Cependant, le groupe qui s'est le plus investi dans le développement de conjugués SID-ATB pour cibler spécifiquement ce pathogène, classé par le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), comme une menace sérieuse (CDC, 2013), est le groupe du Professeur Marvin J. Miller de l'Université de Notre-Dame. Ce sont des SID et conjugués SID-ATB envoyés par ce groupe qui ont fait l'objet des travaux de cette maîtrise.

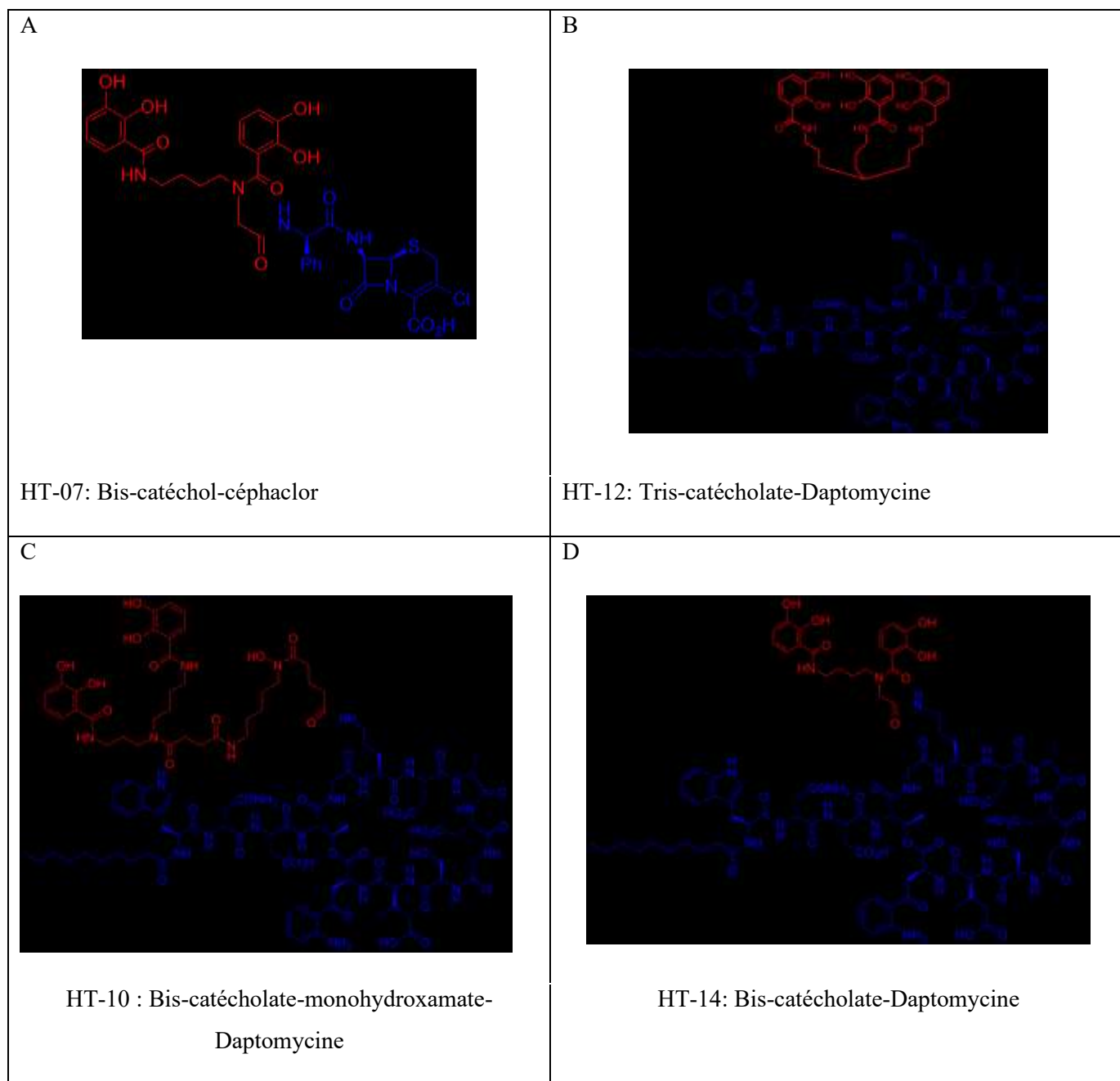


Figure 14: Schéma représentant les structures chimiques des trois conjugués SID-DAP

(En bleu, la portion ATB ; en rouge, la portion SID ; en noir, le lien [espaceur] qui les lient).

Le panel A : conjugué bis-catéchol-céphaclor, panel B : conjugué tris-catécholate-DAP ; panel

C : conjugué bis-catécholate-monohydroxamate-Daptomycine et panel D ; conjugué bis-catécholate-Daptomycine (Ghosh et al., 2018)

1.13 Projets de maîtrise : Objectifs et approches générales

Le travail dans le cadre de cette maîtrise est donc composé de deux parties :

1- SID comme agents protecteurs des plantes

2- SID comme agents pouvant transporter des antibiotiques ciblant des bactéries pathogènes, notamment *A. baumannii*

Les objectifs de cette maîtrise ont liens aux hypothèses de recherche touchant aux deux parties du projet.

Les hypothèses des projets sont les suivantes :

Certaines bactéries agents phytopathogènes produisent des SID qui pourraient être reconnus (directement ou indirectement) par les plantes qui activeraient leurs défenses immunitaires contre la présence putative d'agents pathogènes. Par conséquent, les SID naturels ou synthétiques pourraient être utilisés comme immunostimulants pour activer l'immunité des plantes contre les agents pathogènes.

D'autre part, les SID et les systèmes de transport du fer étant indispensables aux bactéries agents pathogènes, des conjugués synthétiques ATB-SID pourraient livrer des ATB spécifiques (cheval de Troie) aux agents pathogènes qui ne sont autrement pas susceptibles à ces ATB. De plus, les mutants résistants à ces conjugués seraient atténués dans leur virulence.

Pour la partie étudiant les SID comme agents immunostimulants chez les plantes, les objectifs étaient de :

- Sélectionner des SID capables d'inhiber la croissance *in vitro* de l'agent phytopathogène *P. syringae* pv *tomato* DC3000
- Sélectionner des SID inhibiteurs de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et capables d'induire la résistance chez la plante contre *P. syringae* Pst DC3000
- Disséquer l'immunité induite par certains de ces SID procurant une protection contre *P. syringae* Pst DC3000
- Tester *in vitro*, dans du bouillon appauvri en fer, l'innocuité des SID synthétiques sélectionnés par une rhizobactérie de référence bénéfique pour les plantes (*Bacillus subtilis*)

Les objectifs spécifiques et approches générales pour la partie ATB-SID étaient de :

- 1- Déterminer l'activité inhibitrice *in vitro*, dans du milieu gélosé appauvri en fer, d'un conjugué ATB-SID et plus particulièrement la daptomycine-fimsbactine contre *A. baumannii* ATCC19606 et un mutant résistant sélectionné en présence du conjugué.
- 2- D'étudier la virulence (ou fitness) des différentes souches d' *A. baumannii* et mutants résistants aux ATB-SID chez la souris, en utilisant le modèle d'infection intrapéritonéale causant une septicémie.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Résumé en français de l'article

Les sidérophores produits par les bactéries bénéfiques du sol ou encore *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR) pourraient jouer plusieurs rôles, y compris celui de mobilisateurs de nutriments et aussi comme des éliciteurs de défense des plantes. Nous avons investigué le rôle d'un sidérophore synthétique (SID, un mixte bis-catéchol et mono-hydroxamate) qui imite la structure chimique d'un sidérophore naturel, la fimsbactine, produite par le genre *Acinetobacter*, un PGPR impliqué dans l'activation de la résistance contre l'agent phytopathogène, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*. Nous avons avant tout testé pour l'activité antimicrobienne des sidérophores synthétiques contre *Pst* DC3000 *in vitro* (dans un milieu déplété en fer). Après avoir confirmé *in vitro* que les sidérophores synthétiques avaient des effets antimicrobiens contre *Pst* DC3000, nous avons procédé ensuite au test *in planta*, chez *Arabidopsis*, pour vérifier si outre son pouvoir inhibiteur contre *Pst* DC3000, le SID pourrait induire une résistance chez la plante en l'appliquant au niveau des racines et se servant des comptes bactériens au niveau des feuilles comme mesure de résistance systémique de la plante. De plus, nous avons investigué les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de la plante induite par les sidérophores contre l'agent phytopathogène, en se servant de PCR quantitative (qPCR) pour certains gènes marqueurs des voies de résistance. Finalement, afin de s'assurer que les sidérophores synthétiques n'interféreraient pas avec les PGPR, nous avons testé les SID *in vitro* contre une PGPR de référence, *Bacillus subtilis*. Nous rapportons dans cet article que le sidérophore synthétique SID peut jouer plusieurs rôles utiles aussi bien en tant qu'agent antimicrobien que comme un éliciteur de défense de la réponse de défense systémique ou de *priming* de défense chez *A. thaliana* contre *Pst* DC3000, et finalement comme promoteur de croissance pour *B. subtilis*.

Contributions des auteurs de l'article :

Ma contribution dans cette étude était de réaliser toutes expériences *in vitro*, *in planta*, de collecter les données et les analyser et enfin d'écrire l'article.

FB, KB, MJ et FM ont conçu les expériences, analysé les données et écrit le manuscrit. MJM et MG ont conçu et fait la synthèse des sidérophores synthétiques. TAR a aidé à la réalisation des expériences, collecté et analysé les données. L'article est préparé pour soumission dans le journal *Pathogens*

2.2. L'article scientifique

A siderophore analog of fimsbactin from *Acinetobacter* hinders growth of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* and induces systemic priming of immunity in *Arabidopsis thaliana*

Fabrice Betoudji¹, Taha Abd El Rahman¹, Marvin J. Miller², Manuka Ghosh³, Mario Jacques⁴, Kamal Bouarab^{1*}, François Malouin^{1#}

¹Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, QC, Canada.

²Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, IN, USA

³Hsiri Therapeutics, PA 19063, USA

⁴Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Pathologie et microbiologie, QC, Canada

Corresponding authors:

[#]Microbiology : François Malouin (Email : francois.malouin@usherbrooke.ca)

^{*}Plant immune defenses: Kamal Bouarab (Email: kamal.bouarab@usherbrooke.ca)

Abstract

Siderophores produced by beneficial rhizobacteria in the soil or plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) might play many roles, including nutrient mobilizers and as plants defense elicitors. We investigated the role of a synthetic siderophore (SID, mixed bis-catechol-mono-hydroxamate) that mimics the chemical structure of a natural siderophore, fimsbactin, produced by the genus *Acinetobacter* in the resistance against the phytopathogenic agent, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), in *Arabidopsis thaliana*. We first tested the antibacterial activity of the synthetic siderophores against *Pst* DC3000 *in vitro* (in an iron depleted medium). After confirming that the siderophores have antibacterial activity against *Pst* DC3000, we then tested whether the observed *in vitro* activity could translate into the resistance of *Arabidopsis* against *Pst* DC3000, using bacterial counts as endpoints.

Furthermore, we explored molecular actors involved in the induced resistance in *Arabidopsis* by the synthetic siderophores by quantitative PCR. Finally, to assure that the synthetic siderophores would not interfere with PGPRs, we tested them *in vitro* against a reference PGPR, *Bacillus subtilis*. We report here that the synthetic siderophore (SID) is an antibacterial agent as well as an inducer of systemic priming of resistance in *A. thaliana* against *Pst* DC3000, and a *B. subtilis* growth promoting agent.

Keywords: Iron, Siderophores, *Acinetobacter*, *Arabidopsis*, *Pseudomonas syringae*, Induced Systemic Resistance (ISR)

Introduction

To the exception of a few organisms such as lactobacilli and *Borrelia burgdorferi* (Weinberg, 1997; Troxell et al., 2012), virtually all living organisms, including plants, require iron for biological functions. In plants, iron is required for many physiological functions, such as, photosynthesis, chlorophyll biosynthesis, and respiration. The soil is the main source of iron acquisition for plants, which assimilate it through their roots (Thomine and Lanquar, 2011). Although the third most abundant element in the earth's crust (Staiger, 2002), iron is paradoxically in limited quantity for plants because its availability depends on many factors such as the pH of the soil and the redox potential (Morrissey and Gueriot, 2009). Under aerobic conditions and at higher pH, iron is mostly found in its oxidized form; thus, unavailable for uptake by plants.

Because iron is vital to both plants and pathogens, its acquisition is one of the most important adaptative responses for the latter. Like mammals, , plants secrete a variety of proteins and ligand to prevent invading pathogenic bacteria to access iron (Aznar and Dellagi, 2015). To counter this iron restriction by plants, pathogenic bacteria produce siderophores which have higher affinity to iron than phytosiderophores (PS) or other plant iron carriers, to acquire iron

in their host, and promote infection (Franza and Expert, 2013). Siderophores are important virulence factors (Oide et al., 2006; Dellagi et al., 2005; Taguchi et al., 2010). Mammals respond to the presence of bacterial siderophores by secreting lipocalin 2 (Flo et al., 2004), which confiscates the iron-loaded siderophore and prevents the complex from returning to the producing bacteria. Although their role in iron homeostasis is yet to be elucidated, lipocalins are also found in plants (Charron et al., 2008). The plant-pathogen competition for iron has an immediate effect on plant immunity; for example, siderophores produced by *Dickeya dadantii* induce the expression of FERRITIN1 (FER1), an iron storage gene, in *Arabidopsis* (Dellagi et al., 2005). Likewise, the beneficial plant growth-promoting rhizobacteria or PGPR, positively affect plant resistance through iron, by the induced systemic resistance (ISR) mechanism (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Pieterse et al., 2014). Induced systemic resistance is described as an increased protective ability acquired by plants against a wide range of pathogens following stimulation by beneficial bacteria. In the ISR, certain bacterial components such as flagellin or lipopolysaccharide (LPS) termed PAMPs or MAMPs (pathogen-or microbe-associated molecular patterns) are recognized by receptors expressed by plants called PRRs (Pattern-Recognition Receptors); and an immune defense response is initiated upon the recognition of those PAMPs or MAMPs (Boller and Felix, 2009). This first line of defense in plant is called PTI or PAMP-Triggered Immunity, and can stop most pathogens without harming the plant (Dodds and Rathjen, 2010). However, some pathogens are able to interfere with the PTI defense by producing proteins called effectors, which interact directly with PRRs and thus suppress their activity. To respond to the presence of effectors, plants possess a second line of defense which involves expression of a specific protein that targets and inhibits the effector. This second line of plant defense is called ETI, for Effector-Triggered Immunity and is highly effective and specific (Dodds and Rathjen, 2010). Implementation of PTI or ETI defense in plants involves the perception and synthesis of signaling defense molecules, including hormones. The most characterized of those hormones are salicylic acid (SA), ethylene (ET), and jasmonic acid (JA) (Tsuda & Somssich, 2015). Those low molecular weight compounds are powerful inducers of a variety of defense genes and are responsible for the execution of most of the responses required to neutralize pathogens.

It was recently reported that *Acinetobacter* can act as a PGPR (Kuan et al., 2016). The genus *Acinetobacter* is known to produce the siderophore fimsbactin (Proschak et al., 2013 ; Bohac et al., 2019). Since ISR activated by PGPR against pathogens can be triggered by siderophore-mediated competition (Hamid, et al., 2005), we thought that a synthetic siderophore (a mixed bis-catechol-mono-hydroxamate analog, fig. 15) to a natural *Acinetobacter* siderophore, fimsbactin (Proschak et al., 2013a), could have beneficial effects for plants. Hence, in the present study, we evaluated the *in vitro* effect of a synthetic fimsbactin analog against the plant phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (henceforth referred to as *Pst* DC3000) as well as its activity in *Arabidopsis* resistance against the same pathogen. We also evaluated the impact of this synthetic siderophore on the growth of the PGPR *Bacillus subtilis*.

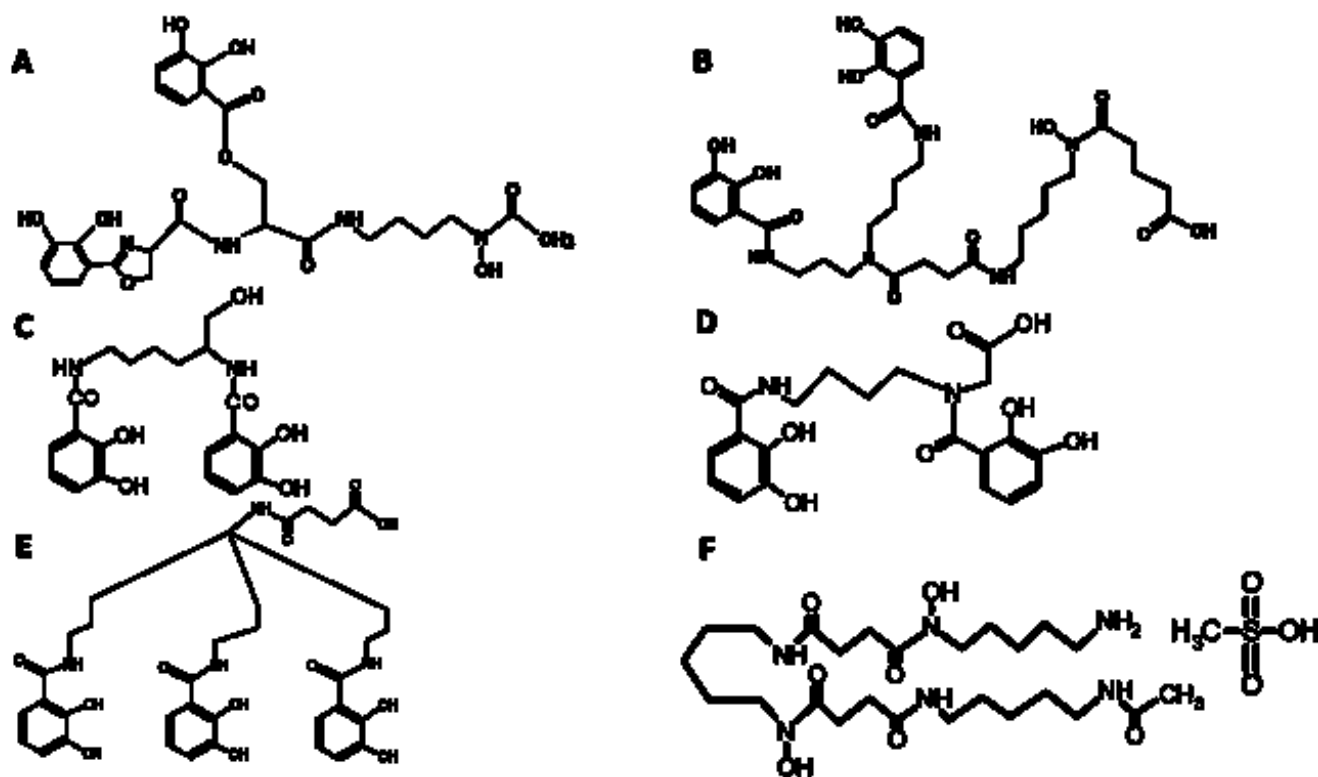


Figure 15: Chemical structures of fimsbactin A and its synthetic analog, SID

Chemical structures of fimsbactin A (A) and its synthetic analog, SID (B) mixed bis-catechol-mono-hydroxamate, myxochelin A (C) a natural siderophore produced by *Azotobacter*

vinelandii, and the synthetic bis-catechol, CAT (D) ; the synthetic tri-catechol (E), and deferoxamine (DFO) mesylate salt (F) used as a control.

Results

SID inhibits *Pst* DC3000 but not *B. subtilis* or *Acinetobacter baumannii* growth in vitro

The iron acquisition machinery in bacteria is overexpressed in iron depleted environments (Andrews et al., 2003). The growth of bacterial pathogens might be significantly compromised if the iron acquisition machinery they express is not adequate for the environment they face. To test whether *Pst* DC3000 possesses iron transport systems for the uptake of the synthetic siderophores (SID and CAT), we depleted LB broth by treating it with the chemical iron chelator, 2, 2'-bipyridyl, and supplementing it with CaCl₂. In this iron environment (*i.e.*, iron-depleted), *Pst* DC3000 is expected to upregulate its iron acquisition systems; and if these include adequate and specific siderophore uptake systems, the bacteria should be able to actively grow compared to what is observed in the control iron-depleted medium where no siderophore was provided. If *Pst* DC3000 does not have the uptake systems for the provided siderophores, the additive effect of the siderophores to that of the bipyridyl would exacerbate the lack of iron in the medium, and thus further limits bacterial growth (antibacterial activity). Fig. 16A shows the growth inhibition of *Pst* DC3000 by the synthetic SID and CAT. The synthetic mixed SID inhibits *Pst* DC3000 growth at all the tested concentrations ($\geq 2 \mu\text{M}$) compared to the control without any siderophore added (one-way ANOVA, *: $p=0.020$; ***: $p=0.0002$; ****: $p<0.0001$) as measured by OD_{595nm}, after 24h of incubation. The bis-catechol CAT also inhibits *Pst* DC3000 growth, although at lower concentrations, the inhibitory activity is lost. There is no growth inhibition of *Pst* DC3000 by the hydroxamate siderophore DFO (up to 32 μM). Since the synthetic SID has a better inhibitory pattern against *Pst* DC3000 *in vitro* than CAT, it was chosen for further testing. Furthermore, for our SID to have applications in agriculture, we wanted to make sure it does not interfere with plant beneficial bacteria. We then tested that hypothesis by using *B. subtilis* as PGPR. Finally, we used *A. baumannii* to

show that it does indeed possess the SID uptake machinery to efficiently thrive in an iron depleted environment. Thus, contrary to the inhibitory activity of the SID against *Pst* DC3000, fig. 16B and 16C show that the mixed SID promotes the growth of *B. subtilis* and *A. baumannii*, respectively. Since the mixed SID is an analog of the natural siderophore, fimsbactin, produced by some strains of *A. baumannii*, it is not surprising that the growth promotion of *A. baumannii* by the mixed SID is significantly more important than that of *B. subtilis*. Fig. 16C shows however that *B. subtilis* is able to utilize this xenosiderophore in the iron depleted condition. This is an indication that the bacterial genus often considered PGPR, *i.e.*, *Acinetobacter* and *Bacillus*, have the appropriate machinery for the utilization of the mixed synthetic SID. The observed properties of SID (inhibitory activity on the pathogen *Pst* DC3000 and growth promoting activity for PGPR) make it ideal for use as a disease-preventing agent. Subsequent experiments were aimed at determining the protecting effect of SID on plants against *Pst* DC3000.

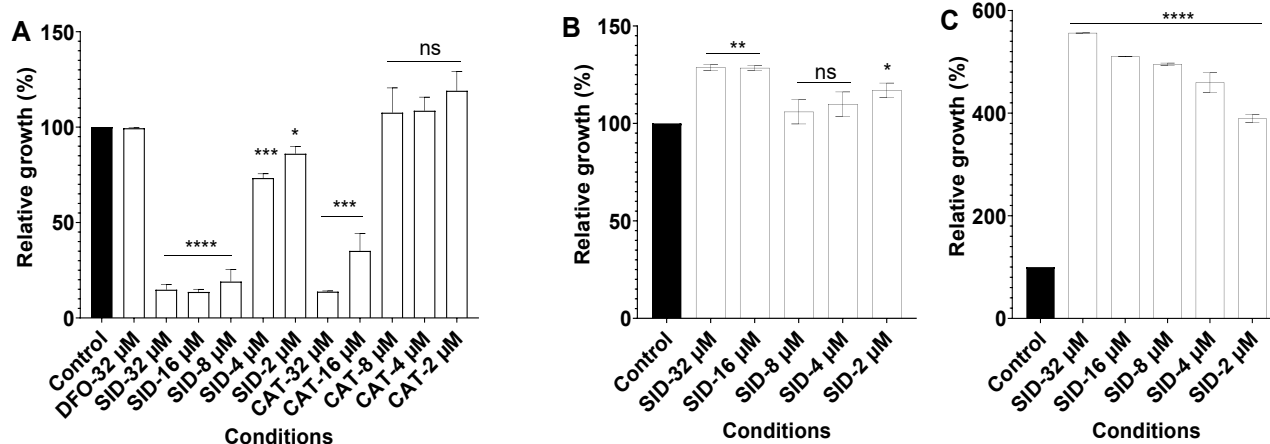


Figure 16: Effect of synthetic siderophores on growth of *Pst* DC3000, *B. subtilis* and of *A. baumannii*

Relative growth of *Pst* DC3000 (A), *B. subtilis* (B), and *A. baumannii* (C) in presence of synthetic siderophores (SID or CAT) was compared to the growth achieved (control, 100%) in the dipyridyl-containing iron-restricted medium in absence of any additional siderophore. The natural hydroxamate siderophore deferoxamine (DFO) was also used as comparator. Growth was measured by optical density (OD_{595nm}) after an incubation of 24h. Data sets marked with asterisks are significantly different from the control as assessed by one-way ANOVA (*: $p=0.020$; ***: $p=0.0002$; ****: $p<0.0001$); ns: difference not statistically significant. Experiments were repeated at least three independent times.

SID promotes priming of *Arabidopsis* systemic resistance against *Pst* DC3000

Our results showed that the mixed SID can act as an antimicrobial against *Pst* DC3000 (fig. 16A), and interestingly it promotes the growth of PGPR (fig. 16B and 16C). Siderophores from beneficial bacteria can also activate plant immunity and induce local resistance against bacterial pathogens such as *Pst* DC3000 or pathogenic fungi such as *Botrytis cinerea* in *A. thaliana*, even when they are exclusively leaf infiltrated, and not roots treated (Dellagi, et al., 2009; Aznar, et al., 2014; Aznar and Dellagi, 2015). We thus tested whether the mixed SID, in addition to its direct antimicrobial effect on *Pst* DC3000, was able to induce the plant immune system response, leading to the activation of resistance against *Pst* DC3000. Since the synthetic SID imitates the chemical structure of the natural siderophore, fimsbactin, produced by the genus *Acinetobacter* and that PGPR are present in the rhizosphere and act through plant roots (Vives-Peris et al., 2019), it is then reasonable to think that if there was any effect of SID on plant immunity, this might occur through the plant roots. To test this hypothesis in plants, we poured the SID (100 μ M in a 10-mL solution) directly in the pots, underneath the plants aerial parts, to assure it gets in contact with the roots without touching the other parts of the plant such as the leaves. We then challenged the pre-treated plant leaves with *Pst* DC3000, 24 h later. Bacterial counts in leaves were assessed on the day of the infection (Day 0) and 3 days after the infection (Day 3). As shown in fig. 17, the SID induced resistance in *Arabidopsis* against *Pst* DC3000 compared to the control (pre-treated with the SID diluent 1% DMSO) at Day 3, with statistically significant ($p < 0.0001$) 7-fold reduction in mean CFU counts per mg of leaves.

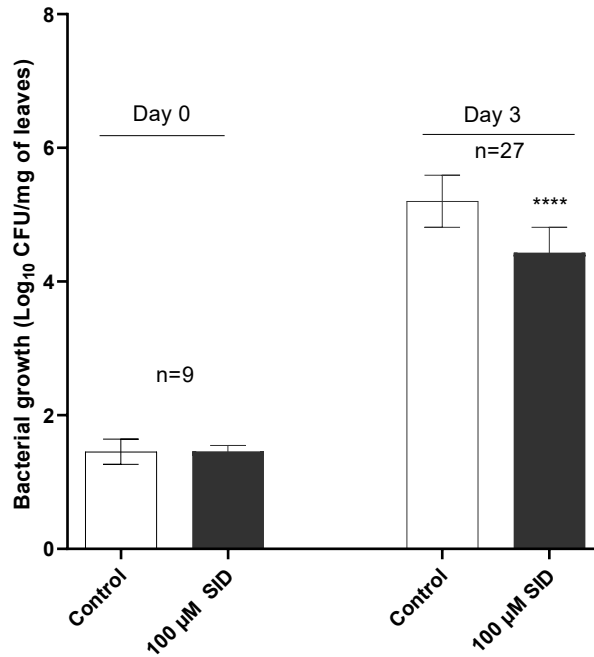


Figure 17: The synthetic SID induces systemic resistance of *Arabidopsis* Col-0 against *Pst* DC3000.

Groups of plants roots were pre-treated with either 100 μ M in 10 mL solution or the mock (1% DMSO), then leaves were syringe infected with *Pst* DC3000 twenty-four hours post SID-treatment. Entire infected leaves were collected at the day of infection (Day 0) and three days after infection (Day 3) for bacterial growth counts. Data sets marked with asterisks are significantly different from the control as assessed by student's test ($p < 0.0001$). The control is the SID diluent 1% DMSO. The results were reproduced in three independent experiments.

This indicates that the contact between SID and the roots of the plants induces some protection in *Arabidopsis* against *Pst* DC3000 at the leave level. The next series of experiments thus aimed at the identification of the molecular actors involved in such a resistance.

SA pathway is primed by SID

To investigate the molecular actors implicated in the resistance conferred by the synthetic SID, we repeated the experiment similar to the resistance assay (fig. 17), although with slight changes (fig. 18). We pre-treated the roots of two groups of plants with either SID or its diluent (1% DMSO); then leaves of the pre-treated groups were challenged either with *Pst* DC3000 (10^6 CFU/mL) or a mock infection (*i.e.*, the diluent used for bacteria 10 mM MgCl₂). Challenged leaves were afterwards collected 8 h post-infection for RNA extraction and we quantified of plant immunity markers involved in the resistance mediated by the SA pathway (e.g., *PR1*) or JA pathway (e.g., *PDF1*), since SA and JA are the two main essential and the most characterized hormones involved in the immune response against pathogenic agents (Pieterse, et al., 2012). Specific primers for marker genes of those pathways (Table 2) were used for quantitative PCR (qPCR). Fig. 18A shows that the level of expression of *PR1* was upregulated in the SID pre-treated group and challenged with *Pst* DC3000 compared to other treatment groups. This corresponds to a priming defense response pattern and indicates that the priming signal was sent from the roots, since leaves were not in contact with the SID. Contrary to the *PR1*, *PDF1.2* (fig. 18B) expression level was not primed by SID. These results suggest that the observed resistance of *Arabidopsis* against *Pst* DC3000 is positively correlated by the priming of the SA pathway.

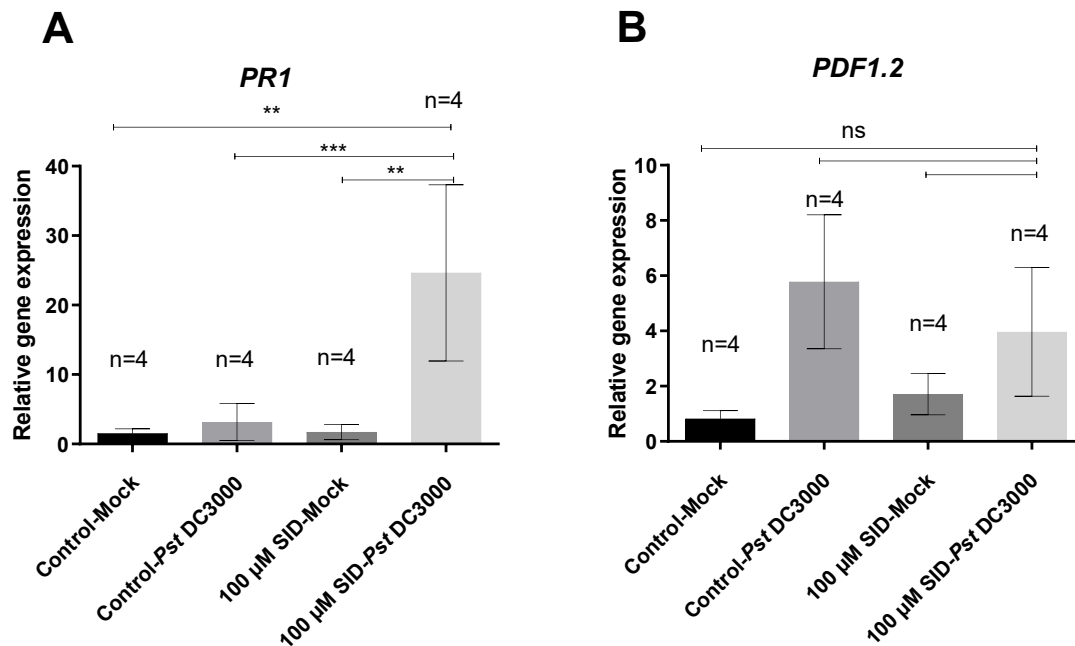


Figure 18: SID induces systemic priming of PR1. Relative expression of the SA pathway marker, PR1 (A) and the JA pathway marker, PDF1.2 (B).

The change in the PR1 and PDF1.2 mRNA levels are measured relative to those of the housekeeping gene EF1 (Elongation Factor 1).. Data sets marked with asterisks: ***($p < 0.0008$); **($p < 0.0015$), are significantly different from the control as assessed by One-Way ANOVA; ns: difference is not significant. The control is the SID diluent (1% DMSO), and the mock infection is the bacterial diluent (10 mM $MgCl_2$). The results were reproduced in three independent experiments.

Discussion

To prevent and control some biotic enemies in agriculture, pesticides are widely used. However, their use is not without harm to the environment and to humans (Damalas and

Eleftherohorinos, 2011). To reduce the use of pesticides, efforts should be made to better understand plants natural defense mechanisms, including interactions between plants and PGPR. PGPR help plants by mobilizing crucial but not readily available nutrients such as iron (Crowley, 2006). Moreover, PGPR facilitate plant growth directly by providing synthesized compounds such as phytohormones or by facilitating nutrients uptake (e.g., iron) and indirectly by promoting resistance against pathogens (Glick, 1995). Among compounds produced by PGPR, siderophores provide nutrient competitive advantages to the producing microorganisms, and can protect plants from invading pathogens (Crowley, 2006). Moreover, microbial siderophores can act as activators of plant immunity (Aznar et al., 2014). However, this activation was until now thought to be local. Our results show that plant immunity elicited by siderophores can be systemic and induced from roots. These results have a biological significance, since PGPR are present in the rhizosphere and are able to induce systemic resistance. Moreover, our results show that the synthetic SID, analog to the natural siderophore fimsbactin, has a direct, antibacterial activity against the phytopathogen *Pst* DC3000 as shown in fig. 16A. This result indicates that this pathogen does not have iron uptake systems for SID and thus starves in the iron depleted medium, an environment similar to that it would encounter in nature. Inversely, in similar in vitro growth conditions, strains members of the PGPR, namely *Acinetobacter* and *Bacillus*, grew better in the presence of the SID (fig. 16CD) compared to their growth controls without the SID. The growth promotion was more pronounced for the *Acinetobacter* strain, which is known to use the natural siderophore fimsbactin. *B. subtilis* also benefits from the SID, although to a lesser degree. Indeed, *B. subtilis* is known to possess iron uptake systems for exogenous siderophores (Grandchamp et al., 2017).

Not only the synthetic SID interfered with *Pst* DC3000 growth *in vitro*, but it also aids the whole plant resist the pathogenic bacteria *Pst* DC3000. More interestingly, the activity was observed after pre-treating plants with the SID and challenging them with the pathogen at the leave level 24h later (fig. 17). Similar observations were made by other research groups before, although at the local level, where leaves were pretreated by purified natural siderophores (e.g., chrysobactin) or whole PGPR then infected with pathogenic agents (Aznar

et al., 2014; Expert et al., 2012; Leeman et al., 1996); whereas in our experiments, roots were instead pretreated with the SID and leaves infected with *Pst* DC3000. Paradoxically, it was observed that siderophores produced by pathogenic bacteria were involved in the promotion of systemic colonization; such was the case with chrysobactin from *Dickeya dadantii* (Dellagi et al., 2009). However, it has also been noted that chrysobactin induces up-regulation of *AtFER1*, an iron storage gene from *Arabidopsis* involved in the protection against the phytopathogen *D. dadantii* (Dellagi et al., 2005). This indicates that siderophores can play different roles, depending on conditions plants find themselves in.

As for the molecular mechanisms of resistance induced by SID against *Pst* DC3000, our results show that the observed resistance is positively correlated with the systemic priming of the SA signaling pathway based on the expression of its marker gene *PR1* (fig. 18A). Similar *PR1* expression patterns in response to iron deficiency were reported by many other research groups but at local level (Aznar et al., 2014; Dellagi et al., 2009; Dellagi et al., 2005; Kieu et al., 2012; Shen et al., 2016b). Conversely, there is no significant difference in the expression of the JA marker, PDF1.2 (fig. 18B).

To our knowledge, this is the first demonstration that a synthetic siderophore is used to promote the plant immune defenses from the roots to the leaves. Based on the results presented in the present work, it would be conceivable to imagine the use of synthetic siderophores as biocontrol agents against phytopathogens in agriculture. Furthermore, it would be of great interest to investigate other types of synthetic siderophores (with various chemical functional groups) in agriculture to uncover whether they would have similar relative effects in plants, and to also determine the spectrum of activity of those synthetic siderophores against various pathogenic microorganisms, bacterial or fungal.

Materials and methods

Synthetic siderophores

The synthetic siderophores, i.e., the fimsbactin analog (SID) (Wencewicz and Miller, 2013), the bis-catechol (CAT) (Ghosh et al., 2018), and the tri-catechol were generously provided by Hsiri Therapeutics (Media, PA). The chemical structures of fimsbactin and myxochelin A (Kunze et al. 1989), and those of their synthetic analogs SID and CAT, respectively, are presented in fig 15 as well as that of the chemical structure of the synthetic tri-catechol. Deferoxamine (DFO) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was used as a comparator in growth inhibition/promotion experiments (also in fig. 15).

In vitro growth inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) by the synthetic SID

Pst DC 3000 was streaked from frozen stocks onto the King's B (KB) selective agar medium containing rifampicin and kanamycin and incubated at 28°C, 48h prior to any experiment. To assess the growth inhibition potential of the SID on the phytopathogen *Pst* DC3000 (González-Lamothe et al., 2012), lysogeny broth (LB) treated with an iron chelator, 2, 2'-bipyridyl (BiP) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at a final concentration of 300 µM, and supplemented with CaCl₂ (50 µg/mL) was used as the iron depleted broth. Twenty-four hours leading up to the experiment, one colony of *Pst* DC3000 was picked from the KB agar plate and inoculated into a flask containing LB broth with the previously mentioned antibiotics and incubated with agitation (200 rpm) at 28°C. On the day of the experiment, the synthetic SID was serially diluted in the iron depleted LB without antibiotic in a 96-well plate. *Pst* DC 3000 was inoculated at a density of 10⁵-10⁶ colony-forming unit per mL (CFU/mL). The optical density (OD_{595nm}) of the plate was read 24h after incubation at 28°C, with shaking. Controls included

non-supplemented iron depleted LB broth as well as broth supplemented with the natural siderophore deferoxamine or FeCl₃.

To check whether the synthetic SID could affect or be utilized by a reference PGPR, *Bacillus subtilis* NCIB3610 was used in the same inhibition assay described here for *Pst* DC3000.

SID-induced resistance of *Arabidopsis* against *Pst* DC3000

To evaluate the plant systemic priming of immunity induced by SID, we used five-week-old *Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0 (Col-0) (González-Lamothe et al., 2012), grown in a 9 pot set (50 mL capacity per pot) in a chamber set at 22°C-23°C, at day time and 19°C at night, with 70% relative humidity and a 12h-photoperiod.

The synthetic SID, diluted in 10 mL water to 100 µM final concentration, was poured directly in the pot, underneath the plant, to maximize absorption by the roots. The mock was the dimethyl sulfoxide (DMSO) to a final concentration of 1% in 10 mL, since the SID was dissolved in that solvent.

An overnight culture of *Pst* DC3000 in LB broth, containing the previously mentioned antibiotics, was pelleted twice at 3800 rpm for 15 min in 10 mM MgCl₂ and resuspended in the starting culture volume (10 mL). The OD_{600nm} of the resuspension was read, then adjusted to get an inoculum of ~10⁵CFU/mL (it is worth mentioning that the inoculum of 10⁵ CFU/mL was used for the bacterial infection/growth experiment while 10⁶ CFU/mL was used for the gene expression experiment). Twenty-four hours after the SID treatment, at least 6 leaves per plant were infiltrated with the inoculum of the prepared *Pst* DC3000, using a 1-mL syringe (González-Lamothe et al., 2012). At Day 0 and Day 3 post-infection, whole infected/infiltrated leaves were collected, weighed, and homogenized in microfuge tubes and plated on KB agar media containing rifampicin and kanamycin, to measure bacterial growth. Three infected leaves from one plant at Day 0, and 3 infected leaves from 3 plants at Day 3

were collected for bacterial counts for each treatment group. Experiments were independently repeated at least three times.

Characterization of immunity markers induced by SID in *Arabidopsis*

To characterize molecular markers involved in the resistance induced by the SID, five-week-old *Arabidopsis* Col-0 plants, grown in the same conditions as mentioned above, were treated with SID or 1% DMSO at the roots as described above. The leaves were infected 24h later with $\sim 10^6$ CFU/mL of *Pst* DC3000 or infiltrated with 10 mM MgCl₂. In total, four groups were used: i) a group treated with SID, then infected with *Pst* DC3000, ii) a group treated with SID, and later infiltrated with 10 mM MgCl₂ (mock infection), iii) a group treated with 1% DMSO (mock SID), then infected with *Pst* DC3000, and finally iv) a group treated with 1% DMSO and infiltrated with 10 mM MgCl₂. Eight hours post-infection/infiltration, infected/infiltrated leaves were collected and immediately frozen in liquid nitrogen.

Total RNA was extracted from leaves using the RNeasy Plant Mini Kit following the manufacturer's (Qiagen, Germantown, MD, USA) recommendations. The extracted RNA was treated with DNase to remove all DNA residues, then quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). cDNA synthesis was performed with 2 μ g total RNA using the SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON). The target genes were quantified by qPCR using the Advanced qPCR Master Mix (Wisent, St-Bruno, QC) specific primers, and sterile water in a 20 μ L total volume solution. The CFX96 system (Bio-Rad, Mississauga, ON) was used to detect the amplification level and was set with an initial step of 10 min at 95°C followed by 40 cycles alternating between 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. To analyze the relative expression of the target genes and immune defense pathways (Table 1), calculations were made using the $\Delta\Delta$ cycle threshold (CT) mean from technical triplicates. Briefly, the threshold cycle (Ct) values of target genes were normalized to the endogenous control gene, the elongation factor 1 or *EF1* ($\Delta CT = C_{t\text{target}} - C_{t\text{endogenous}}$)

and compared with a calibrator ($\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{calibrator}}$). Relative expression was calculated using the following formula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. The specific primers for target genes used in this study were synthesized by The Integrated DNA Technologies (IDT Canada, Kanata, ON) and listed in Table 1.

Table 1: List of primers used in this study

Gene	GenBank accession	Pathway	Primer sequence
<i>AtPR1</i>	AT2G14610	Salicylic acid	F: CTCATACACTCTGGTGGG R: TTGGCACATCCGAGTC
<i>AtPDF1.2</i>	AT5G44420	Jasmonic acid	F: TCTTTGGTGCTAAATCGTGTGT R: TGTAACAACAACGGGAAAATAAACA
<i>AtEF1</i>	AT5G60390	Elongation factor Tu	F : TCTCCGAGTACCCACCTTTG R : TCCTTCTTGTCCACGCTCTT

Statistical analysis

GraphPad Prism version 8 (GraphPad, San Diego, CA) was used for all analyses. Data were subjected to either a t-test pairwise comparisons ($P < 0.05$) followed by Mann-Whitney post-test or one-way analysis of variance (ANOVA), depending of the experiment. The ANOVA

was used with Dunnett's post-test to control for multiple comparisons. Specific tests are described in the figure legends.

Acknowledgments

This work was supported by a Team Grant from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et Technologies (FRQNT) to FM, KB, and MJ. We are most thankful to Hsiri Therapeutics for providing the synthetic siderophores used in this study.

Author contributions

FB, KB, MJ and FM designed the research, analyzed the data and wrote the manuscript. MJM and MG designed and performed synthesis of SID and CAT. FB and TAR performed the experiments.

References

1. Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quinones, F.. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, 27(2–3), 215–237
2. Aznar, A. *et al.*,. Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. *Plant Physiol.*, **2014**, 164(4), 2167–2183.
3. Aznar, Aude, & Dellagi, A.. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: What can we learn from animals? *J. of Exp. Bot.*, **2015**, 66(11), 3001–3010.
4. Bohac, T. J., Fang, L., Giblin, D. E., & Wencewicz, T. A. . Fimsbactin and Acinetobactin Compete for the Periplasmic Siderophore Binding Protein BauB in Pathogenic *Acinetobacter baumannii*. *ACS Chem. Biol.*, **2019**, 14(4), 674–687.

5. Boller, T., & Felix, G. . A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2009**, 60(1), 379–406.
6. Charron, J.-B. F., Ouellet, F., Houde, M., & Sarhan, F.. The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biol.*, **2008**, 8:86.
7. Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G.. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2011**, 8(5), 1402–1419.
8. Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D.. Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiol.*, **2009**, 150(4), 1687–1696.
9. Dellagi, A, *et al.*,... Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.*, **2005**, 43(2), 262–272.
10. Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. . Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.*, **2010**, 11(8), 539–548.
11. E. Crowley, D.. Microbial Siderophores in the Plant Rhizosphere. *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, 1st ed.; Barton, LL, Abadia, J, Eds., Springer: Netherlands, **2006**; , pp. 169–198.
12. Expert, D., Franza, T., Dellagi, A., & Walker, J. M. . Iron in Plant-Pathogen Interactions. *Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbes Associations*, 1st ed.; Expert, D, O'Brian, MR, Eds, Springer: Netherlands, **2012**; pp: 7-39.
13. Flo, T. H., *et al.*, . Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. **2004**, 432 (7019):917-921
14. Franza, T., & Expert, D. . Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: An “à la carte” menu. *Mol Plant Pathol.*, **2013**, 14(4), 429–438.
15. Ghosh, M., Lin, Y. M., Miller, P. A., Möllmann, U., Boggess, W., & Miller, M. J. . Siderophore Conjugates of Daptomycin are Potent Inhibitors of Carbapenem Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infect Dis.* **2018**, 4(10): 1529-1535.
16. Glick, B. R. . The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*, **1995**, 41(2), 109–117.
17. González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., & Bouarab, K. . The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell*, **2012**, 24(2), 672–777.

18. Grandchamp, GM; Caro, L; Shank, E. . Pirated Siderophores Promote Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2017**, 83(10), 1–17.
19. Meziane, H, VAN DER Sluis, I, VAN Loon, LC; ., Höfte, M, & Bakker, PA. . Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol*, **2005**, 6(2), 177–185.
20. Kieu, N. P., *et al.*, Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *dickeya dadantii* and *botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*, **2012**, 13(8), 816–827.
21. Kuan, K. B., Othman, R., Abdul Rahim, K., & Shamsuddin, Z. H. . Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, **2016**, 11(3), 1–19.
22. Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Höfle, G., & Reichenbach, H. . Myxochelin A, A New Iron-chelating Compound from *Angiococcus Disciformis* (Myxobacterales). *J. Antibiot.*, **1989**, (40), 14–17.
23. Leeman, M., Den Ouden, E. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. . Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, **1996**, 86(2), 149–155.
24. Lugtenberg, B, Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **2009**, 63:541-556
25. Morrissey, J., & Gueriot, M. L.. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem Rev*, **2009**, 109(10), 4553–4567.
26. Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., & Turgeon, B. G. . NPS6 , Encoding a Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in Siderophore-Mediated Iron Metabolism, Is a Conserved Virulence Determinant of Plant Pathogenic Ascomycetes . *Plant Cell*, **2006**, 18(10), 2836–2853.
27. Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. . Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **2012**, 28(April), 489–521.
28. Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. . Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Ann Rev Phytopathol*, **2014**, 52(1), 347–375.
29. Proschak, A., Lubuta, P., Grün, P., Löhr, F., Wilharm, G., De Berardinis, V., & Bode, H. B. . Structure and Biosynthesis of Fimsbactins A-F, Siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem*, **2013**, 14(5), 633–638.

30. Shen, C., Yang, Y., Liu, K., Zhang, L., Guo, H., Sun, T., & Wang, H. . Involvement of endogenous salicylic acid in iron-deficiency responses in Arabidopsis. *J Exp Bot*, **2016**, 67 (14): 4179-4193.
31. Staiger, D. . Chemical strategies for iron acquisition in plants. *Angew Chem - Int Ed Engl*, **2002**, 41(13), 2259–2264.
32. Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. . The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J Bacteriol*, **2010**, 192(1), 117–126.
33. Thomine, S., & Lanquar, V. . Iron Transport and Signaling in Plants. *Transporters and Pumps in Plant Signaling*, 1st ed., Geisler, M, Venema, K, Eds, Springer: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, **2011**, Volume 7, pp: 99-131
34. Troxell, B., Xu, H., & Yang, X. F. . *Borrelia burgdorferi*, a pathogen that lacks iron, encodes manganese-dependent superoxide dismutase essential for resistance to streptonigrin. *J Biol Chem*, **2012**, 287(23), 19284–19293.
35. Tsuda, K., & Somssich, I. E. . Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol*, **2015**, 206(3), 932–947.
36. Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M.. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Rep*, **2019**, <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
37. Weinberg, E. D. . The Lactobacillus Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspect Biol Med*, **1997**, 40(4), 578–583.
38. Wencewicz, T. A., & Miller, M. J.. Biscatecholate-monohydroxamate mixed ligand siderophore-carbacephalosporin conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Acinetobacter baumannii*. *J Med Chem*, **2013**, 56(10), 4044–4052.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Détermination de l'activité inhibitrice des conjugués ATB-SID contre les différentes souches d'*A. baumannii* et relation structure-activité selon le profil d'utilisation des SID par la bactérie

3.1.1 Souches bactériennes

Les souches utilisées sont ATCC 19606 d'*A. baumannii* et ses mutants résistants qui ont été sélectionnés sur des milieux gélosés appauvris en fer, à l'aide du chélateur Chelex®100 resin puis supplémentés d'oligo-éléments (détails similaires à ceux retrouvés plus bas pour le test en bouillon), et contenant les différents conjugués DAP-sidérophores (DAP-SID), dont les noms et structures chimiques sont sur la fig. 14. Pour sélectionner les mutants résistants, les conjugués ont été utilisés aux concentrations sous inhibitrices également en milieu gélosé.

3.1.1.1 Activité inhibitrice

Pour preuve de concept, la méthode d'inhibition sur agarose a d'abord été utilisée, pour tester l'activité de HT-10. Pour tester l'activité de HT-10 contre ATCC 19606 et son mutant résistant au conjugué HT-10, le milieu gélosé Trypcase Soja (TSA) a été appauvri en fer en y ajoutant 200 µM du chélateur du fer, 2, 2'-Bipyridyl (BiP) et en y supplémentant avec 50 µg/mL de

chlorure de calcium (CaCl_2). La veille de l'expérience, les souches à tester ont été ensemencées, à partir de stocks congelés, sur du milieu TSA régulier et les géloses ensemencées incubées à 35°C. Au jour de l'expérience, 2 à trois colonies ont été prélevées à l'aide d'un coton-tige et suspendues dans un tube contenant 3 mL du tampon phosphate salé (PBS), dans le but d'obtenir un inoculum correspondant au standard 0.5 MacFarland (0.5 MacFarland = 1×10^8 CFU/mL). L'inoculum ainsi obtenu est ensemencé, toujours à l'aide d'un coton-tige, sur la gélose TSA déplétée en fer (e.g. : 200 μM BiP, 50 $\mu\text{g/mL}$ CaCl_2). Une fois que la gélose sur laquelle est inoculée la souche est sèche, une bandelette stérile imbibée du conjugué (HT-10), de 100 μL à 40 μM , est placée au centre du pétri, créant une symétrie sur la gélose. Ensuite, diagonalement, les bandelettes contenant les différents SID (aux mêmes volumes et concentrations que HT-10) ainsi que les autres témoins comme le chlorure de fer (FeCl_3) ainsi la DAP sont déposées au-dessus de la première bandelette contenant le conjugué. Les pétris sont alors laissés ouverts dans l'enceinte biologique pour sécher. Une fois qu'ils sont secs, les pétris sont placés dans l'incubateur à 35°C pour 18 à 24h. À la suite de l'incubation, les photos sont prises avec une caméra pour montrer les zones d'inhibition créées par le conjugué ou encore les zones de compétition entre le conjugué et les SID ou témoins.

Les tests de susceptibilités des conjugués antibiotique-sidérophore pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été réalisés en suivant les méthodes standard de microdilution du CLSI (Clinical Laboratories Standards Institute, 2018 ; Hackel et al., 2019). Le milieu Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB, BD, Mississauga, ON, CA) déplété en fer a été utilisé selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2018). En bref, 100 g de Chelex®100 resin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA) ont été ajoutés à 1L du milieu CAMHB préalablement autoclavé et le milieu agité pendant 2h à la température pièce afin de retirer tous les cations du milieu. Après 2h d'agitation, le bouillon a ensuite été filtré à l'aide de filtres de 0.2 μm dans le but de retirer la résine, puis le pH ajusté à 7.3 avec l'acide chloridrique. Le milieu déplété en fer ainsi obtenu a ensuite été supplémenté de calcium (CaCl_2), de magnésium (MgCl_2) et du zinc (ZnSO_4) aux concentrations finales de 20-25 $\mu\text{g/mL}$, 10-12.5 $\mu\text{g/mL}$ et 0.5-1.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivement ; puis passé de nouveau au filtre de 0.2 μm .

Les concentrations stocks des conjugués ATB-SID sont préparées et diluées aux concentrations de travail le jour de l'expérience. Ces concentrations de travail sont alors distribuées dans les puits de la 1ère colonne de la plaque à 96 puits, puis diluées en série dans le milieu déplété en fer préalablement distribué dans les puits jusqu'aux puits de la 10ème colonne. Les 11ème et 12ème colonnes contiennent le milieu déplété en fer et sont utilisées comme témoin positif (colonne 11, contenant les bactéries mais sans antibiotique) et négatif (colonne 12, ne contenant ni antibiotique, ni bactéries). L'inoculum bactérien est ensuite préparé et ajouté aux puits des colonnes 1 à 11 de la plaque à 96 puits. L'inoculum contient les bactéries préparées à partir des colonies parties sur du milieu gélosé la veille. Les colonies ont été resuspendues dans un tube snapcap de 14 mL contenant 3 mL de la saline (PBS) pour obtenir le standard 0.5 McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ CFU/mL). Une dilution de rapport 1 :300 est ensuite préparée à partir du standard 0.5 McFarland dans un tube contenant 10 mL du milieu déplété en fer pour arriver à une densité bactérienne entre 1×10^5 et 1×10^6 CFU/mL. L'inoculum final est alors distribué dans les puits des colonnes 1 à 11 dans un volume total de 100 µL. La plaque est ensuite secouée afin de bien mélanger les liquides se trouvant dans les puits, puis mise dans l'incubateur à 37°C durant 20-24h avant de faire la lecture visuelle, puis dans un lecteur de plaques à 595nm.

3.1.1.2 Relation structure-activité selon le profil d'utilisation des SID par les souches

d'*A. baumannii*

Afin de déterminer si les mutants résistants aux ATB-SID ont perdu leur capacité à utiliser les SID, le bouillon *Muller Hinton Cation Adjusted* (MHBCA) a été appauvri en fer en y ajoutant le chélateur du fer, BiP à 200 µM et supplémenté de 100 µg/mL de CaCl₂. Le bouillon a été distribué dans les puits de plaque à 96 puits. Ensuite, différents SID ont été distribués par dilution en série dans les puits. L'inoculum bactérien a ensuite été ajusté à environ 1×10^5 - 1×10^6 CFU/mL et distribué dans les puits. Le contrôle positif (sans sidérophore) est représenté par

les puits contenant juste le bouillon appauvri en fer et les bactéries. Les plaques sont alors mises dans l'incubateur à 35°C pour 18-24h ; après quoi, la lecture de la densité optique est faite au spectrophotomètre à 595 nm.

3.1.1.3 Séquençage des mutants résistants d'*A. baumannii* obtenu par Illumina

Des mutants résistants d'*A. baumannii* aux conjugués ATB-SID ont été sélectionnés par nos collaborateurs de l'Université de Notre Dame en utilisant un milieu pauvre en fer contenant une concentration sous-inhibitrice des conjugués. Le séquençage génomique de ces mutants (12 par conjugué) a été effectué par Illumina® afin d'identifier les composantes modifiées lors de cette sélection en les comparant au parent ; ce qui nous orienterait sur de potentiels modes d'action des conjugués. L'ADN génomique des mutants résistants ainsi que celui du parent (ATCC 19606) a été extrait et quantifié en servant d'un kit d'extraction commercial et en suivant les recommandations du fabricant (Qiagen, Toronto, ON, CA). Les librairies ont été apprêtées selon une méthode couramment utilisée et optimisée par le laboratoire du Professeur Sébastien Rodrigue, Université de Sherbrooke (Rodrigue et al., 2010) ainsi que du protocole de *New England Biolabs* (NEBNext Ultra II DNA library prep kit), incorporant un indice de 6bp aux échantillons pour une démarche multiplex. Les librairies ont été séquencées par la plateforme Illumina HiSeq2000 à Genome Québec (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre). Afin de séquencer ~200 génomes, environ 200 millions *paired-end reads* de 100bp ont été générées, soit environ 40 fois chacun. Les séquences des mutants ainsi obtenues ont été alignées sur le génome de référence d'*A. baumannii* ATCC 19606 (Davenport et al., 2014), se servant de la méthode Burrows-Wheeler (Li & Durbin, 2009) pour l'identification de mutations de types *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), *insertions and deletions* (indels) et autres réarrangements dans le génome. Seuls les SNPs et indels retrouvées chez la majorité de chaque groupe de 12 mutants et prédisant une perte de fonction des protéines encodées ont été retenues (haut impact). L'identité des protéines a été déterminée par la banque des données UniProt.

3.2 Étude comparative de la virulence des mutants résistants par rapport au parent

dans le modèle murin d'infection intrapéritonéale

Le protocole pour l'infection des souris a été soumis au comité d'éthique de la faculté des Sciences de l'Université de Sherbrooke qui l'a approuvé.

Les souris femelles CD-1 âgées de 5 à 6 semaines et pesant entre 22-24 grammes ont été utilisées dans l'étude. Il y a dans la collection 12 mutants résistants par conjugué ; cependant, pour comparer la virulence, seulement quelques mutants résistants (MM2-R1, MM3-R1, MM4-R1, MM4-R9 et MM5-R1) par groupe ayant des phénotypes et mutations représentatifs des douze (voir tableau 1) ont été utilisés. Le parent *A. baumannii* ATCC 19606 et les mutants résistants sont inoculés aux souris par injection intrapéritonéale (IP) dans un volume de 250 µL de tampon phosphate saline (PBS) à l'aide de seringues avec des aiguilles de calibre 27G ½. Les cultures bactériennes sont parties sur gélose TSA à la veille de l'infection à partir des souches congelées. Au jour de l'infection, des colonies ont été piquées de ces géloses à l'aide de boucles stériles et resuspendues dans le tampon afin d'obtenir un inoculum équivalent au standard McFarland 1. Les inocula sont ensuite déposés sur gélose TSA afin de déterminer le nombre de bactéries inoculées aux souris. Quatre souris sont utilisées par souche bactérienne. Les souris sont observées régulièrement afin de s'assurer que les points limites ne soient pas atteints. Les organes comme le foie, la rate, les reins et le sang sont collectés dans des tubes 14 mL contenant du PBS stérile à un temps déterminé après avoir préalablement anesthésié les souris par injection intramusculaire (IM) de 87 mg/kg de kétamine HCl et 13 mg/kg de xylazine (à raison de 1 µL par gramme de poids corporel). L'injection IM est réalisée à l'aide d'une seringue à insuline (0.3 cc) et une aiguille de calibre 29G ½. Les organes collectés sont ensuite homogénéisés et étalés sur des géloses pour déterminer le nombre de bactériens. Le nombre de bactéries est déterminé par organes et la comparaison est faite entre le nombre de bactéries de la souche sauvage se trouvant dans un organe celui des mutants se retrouvant dans le même organe.

Tableau 2 : Liste des mutants résistants et les conjugués utilisés pour leur sélection ainsi que les protéines fréquemment mutées

Mutants et conjugué	Nombre des mutants résistants	Mutations protéiques les plus conservées par conjugué
MM2 [HT-10 Mixte SID-DAP (hexadentate)]	12	ENW74445.1 : Récepteur dépendent de TonB ENW75701.1 : Système de sécrétion de type 1, domaine cible C-terminal
MM3 (HT-14 Bis-catécholate-DAP)	12	ENW75701.1 : Système de sécrétion de type 1, domaine cible C-terminal ENW76789.1 : Protéine hypothétique ENW77701.1 : Protéine membranaire non caractérisée ENW76612.1 : Régulateur de réponse, OmpR/PhoB-type, DNA-binding IR215: F911_00215-216 : Région intergénique
MM4 [HT-12 Tris-catécholate-DAP (hexadentate)]	12	ENW74445.1 : Récepteur dépendent de TonB ENW75701.1 : Système de sécrétion de type 1, domaine cible C-terminal ENW76789.1 : Protéine hypothétique ENW76611.1 : Domaine ATPase/HSP90 ENW75951.1 : Protéine avec domaine de liaison au FAD interagissant avec les sidérophores
MM5 (HT-07 Bis-catécholate-Céfaclor)	12	ENW75701.1 : Système de sécrétion de type 1, domaine cible C-terminal ENW76789.1 : Protéine hypothétique ENW76611.1 : Domaine ATPase/HSP90 ENW76577.1 : Biosynthèse du coenzyme A ENW76439.1 : Protéine FabZ porteuse d'acyle ENW76440.1 : Protéine porteuse d'acyle IR1683: F911_01683-01684 : Région intergénique

Les lettres ENW suivies de chiffres représentent les numéros d'accèsion des protéines sur la base de données ncbi.nlm.nih.gov/protein. Les lettres MM accompagnées de numéros représentent les mutants résistants ; les conjugués utilisés pour la sélection des mutants résistants sont entre parenthèses, après MM et numéros.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ASSOCIÉS AUX ATB-SID

4.1 Détermination de l'activité inhibitrice du conjugué DAP-SID (HT-10) contre *A.*

***baumannii* ATCC 19606 et un mutant (MM2-R1) en présence du conjugué**

Le test d'inhibition d'*A. baumannii* ATCC 19606 et son mutant MM2-R1 par le conjugué HT-10 (fig. 14) ainsi que la compétition de HT-10 avec les différents SID a été réalisé sur milieu gélosé, appauvri en fer. Sur la gélose appauvrie en fer, la bactérie est forcée de déployer ses mécanismes d'acquisition du fer. En agissant de la sorte, elle internalise le SID sur lequel est attaché l'antibiotique ; qui va alors effectuer son action inhibitrice. Comme les images (fig. 19, 20 et 21) suivantes le montrent, la souche parente ATCC 19606 est clairement sensible au conjugué, alors que le mutant résistant sélectionné à partir de ce conjugué ne l'est pas.



Figure 19: Inhibition d'*A. baumannii* ATCC 19606 par le conjugué HT-10 (bandelette verticale). La bandelette transversale contient la DAP. Il y a une claire zone d'inhibition autour de la bandelette HT-10. La DAP n'a aucune activité contre *A. baumannii* ATCC 19606.

La fig. 19 montre une zone d'inhibition très claire autour de la bandelette imbibée du conjugué HT-10 (bandelette verticale). La DAP (bandelette horizontale) n'a aucune activité contre *A. baumannii* ATCC 19606 ; ceci est un résultat attendu puisque la DAP est un ATB spécifique aux bactéries à Gram positif. Cependant, quand elle est conjuguée à un SID spécifique à *A. baumannii*, cette dernière est capable de l'internaliser et le conjugué peut alors tuer la bactérie.

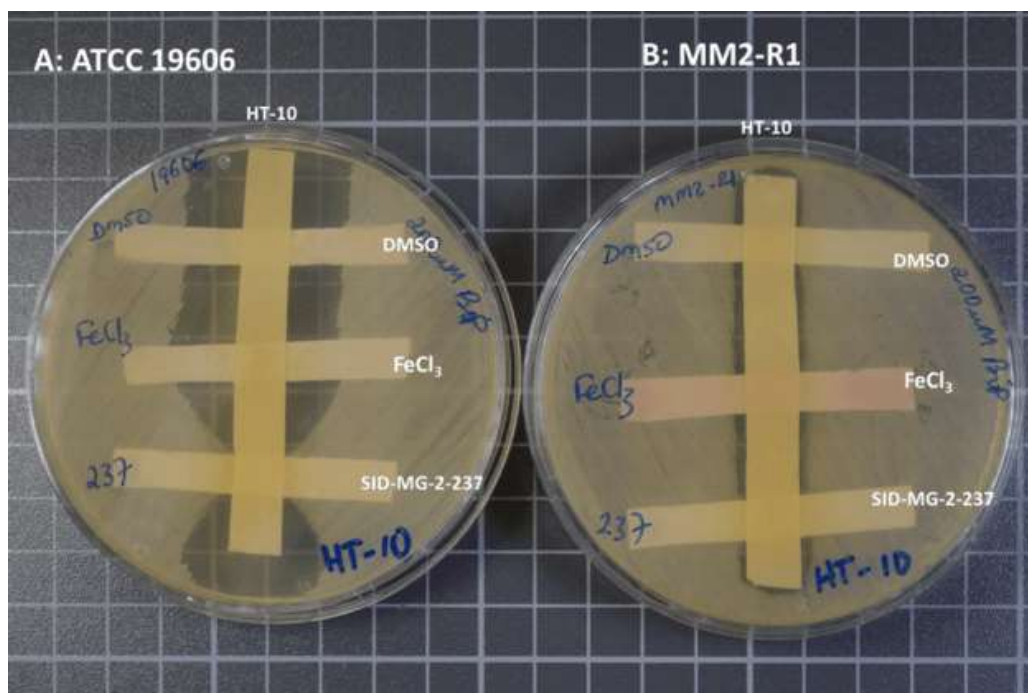


Figure 20: Inhibition d’*A. baumannii* ATCC 19606 (A ou gauche) et du mutant résistant MM2-R1 (B ou droite) par le conjugué HT-10 (bandelettes centrales). La bandelette transversale supérieure contient du DMSO (le diluant utilisé); celle du milieu contient le FeCl_3 et celle inférieure contient le SID bis-catéchol, MG-2-237.

Il y a une claire zone d’inhibition autour de la bandelette HT-10 chez le parent ATCC 19606 ; alors que la zone d’inhibition n’est pas très évidente chez le mutant résistant MM2-R1. La zone d’inhibition autour de la bandelette HT-10 est rétrécie en présence du SID bis-catéchol, alors qu’elle reste très prononcée autour de FeCl_3 et DMSO chez ATCC 19606, alors que le mutant résistant MM2-R1 semble insensible à l’effet de tous ces composés.

La fig. 20 indique de manière éloquent que le conjugué HT-10 est inhibiteur contre la souche sauvage ATCC 19606 d’*A. baumannii* (gauche), alors que le mutant résistant MM2-R1 (droite) sélectionné sur le conjugué HT-10 est clairement résistant. De plus, le SID bis-catéchol MG-2-237, semble contrecarrer l’effet inhibiteur de HT-10 chez ATCC 19606 comme noté par la réduction de la zone d’inhibition à l’intersection des bandelettes contenant HT-10 et MG-2-237. Ce résultat suggère qu’il y a une compétition entre HT-10 dont la portion SID est un bis-

catécholate-monohydroxamate et MG-2-237 (un bis-catéchol SID) pour le ou les récepteur (s) responsable (s) d'internaliser ces deux molécules. En outre, l'addition du fer sous la forme FeCl_3 n'arrive pas à aider la bactérie à renverser l'effet inhibiteur de HT-10, indiquant sur la gélose déplétée en fer, une source directe du fer n'est pas meilleure pour l'assister à rétablir sa croissance normale.

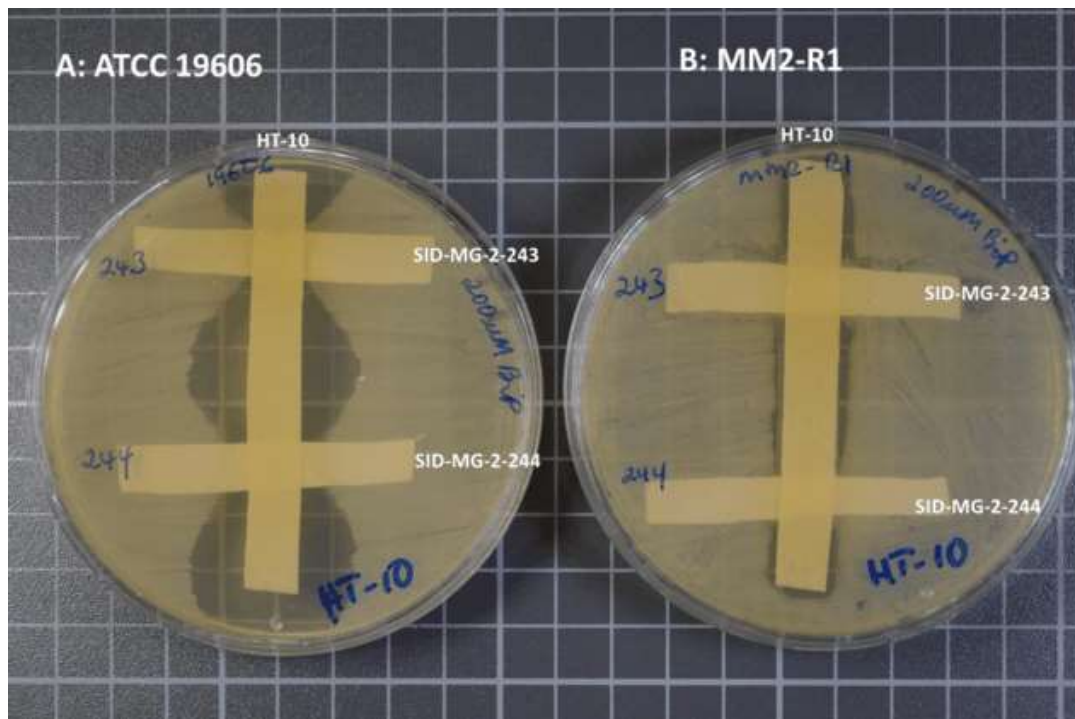


Figure 21: Inhibition d'*A. baumannii* ATCC 19606 (A ou gauche) et du mutant résistant MM2-R1 (B ou droite) par le conjugué HT-10 (bandelettes centrales). La bandelette transversale supérieure contient le SID bis-catéchol-N-hydroxamate, MG-2-243 ; celle inférieure contient le SID tris-catéchol, MG-2-244.

Il y a une claire zone d'inhibition autour de la bandelette HT-10 chez le parent ATCC 19606 ; alors que la zone d'inhibition n'est pas très évidente chez le mutant résistant MM2-R1. La zone d'inhibition autour de la bandelette HT-10 est légèrement rétrécie en présence du SID tris-catéchol (MG-2-244), alors qu'elle semble presque disparaître en présence du SID bis-catéchol-N-hydroxamate.

La fig. 21 montre encore une fois de plus la compétition observée entre le conjugué HT-10 et les SID. Dans cette figure, on voit clairement la réduction de la zone d'inhibition créée par HT-10 à l'intersection des bandelettes imbibées de HT-10 et de MG-2-244 (tris-catéchol) chez ATCC 19606. Cependant, cette zone d'inhibition semble disparaître à l'interaction des bandelettes imbibées de HT-10 et MG-2-243 (bis-catéchol-N-hydroxamate), indiquant un plus haut niveau de compétition entre HT-10 et MG-2-243. Cette observation n'est que logique quand on sait que la partie SID de HT-10 est justement le SID bis-catéchol-N-hydroxamate.

4.2 Propriétés des conjugués synthétiques ATB-SID

Tableau 3 : Tableau représentant les propriétés des conjugués ATB-SID contre les souches d'*A. baumannii* ainsi les mutations les plus communes observées après séquençage de quelques mutants résistants.

Souches sélectionnées testées pour phénotypes	Mutations géniques communes	CMI (µg/mL)			
		HT-10 Mixed/DAP (hexadentate)	HT-12 Tris-cat/DAP (hexadentate)	HT-14 Bis-cat/DAP	HT-07 Bis-cat/Cef
ATCC 19606		0.12-0.25	0.5	2-4	0.12
MM2(HT-10)-R1	TBDP, T1SS	4 (16x)	4	4	0.06
MM4(HT-12)-R1	TBDP, T1SS/HypP	8 (32x)	8	8	0.06
MM4(HT-12)-R9	TBDP, T1SS/HypP	4 (16x)	4	8	0.06
MM3(HT-14)-R1	T1SS, HypP, UMP, RR	2 (8x)	>64 (>128x)	32 (8x)	0.06
MM5(HT-07)-R1	T1SS, HypP, ATPase	0.12	0.25	2	>4 (>32x)

TBDP : *TonB-dependent protein*; un récepteur membranaire de sidérophore dépendant de TonB T1SS: *type 1 secretion system*; un système de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif employant les clusters des gènes *hly* et *tol*. HypP: *hypothetical protein*; protéine hypothétique annotée mais n'ayant pas été caractérisée en détails. UMP : *uncharacterized membrane protein* ; protéine membranaire non caractérisée RR : *response regulator* ; régulatrice de

réponse est une protéine qui régule les réponses cellulaires par rapport aux changements de l'environnement et faisant partie des systèmes de régulation à deux composants. Les souches MM2-R1, MM4-R1 et MM4-R9, MM3-R1, MM5-R1 ont été respectivement sélectionnées en présence des conjugués SID mixte-daptomycine, tris-catéchol-daptomycine, bis-catéchol-daptomycine et bis-catéchol-céfaclor.

Le tableau 3 montre clairement que tous les conjugués sont très actifs contre la souche typique d'*A. baumannii* ATCC 19606, alors que les mutants résistants sont moins susceptibles au conjugué utilisé pour leur sélection. Les CMI des mutants (MM2 et MM4) suggèrent une résistance croisée entre HT-10 et HT-12 qui ont des sidérophores hexadentates (résistance qui pourrait donc être due à une mutation dans l'appareillage de transport, p. ex. TBDP). Par contre, il n'y a pas de résistance croisée observée entre HT-14 et HT-07, ce qui suggère que la résistance à HT-14 pourrait être due à une moindre susceptibilité à la daptomycine (UMP, RR) et que la résistance à HT-07 pourrait être due à un problème pour le transport des bis-catéchol (ATPase) ou reliée à une cible (mutation non-identifiée). Le résultat (non montré) de la CMI de la souche parente (ATCC 19606) à la DAP est de : >128 µg/mL.

4.3 Profil d'utilisation des SID par la souche sauvage ATCC 19606 et le mutant MM2-

R1

La capacité des mutants résistants à utiliser les SID conjugués à la DAP a été évaluée dans du bouillon déplété en fer. La capacité du parent et des mutants résistants à utiliser les SID témoins comme le ferrichrome et la deferrioxamine ainsi que le FeCl₃ ont été aussi évalués dans le test. La fig. 22 montre les profils d'utilisation des SID du parent ainsi ceux du mutant MM2-R1 dans le bouillon déplété en fer.

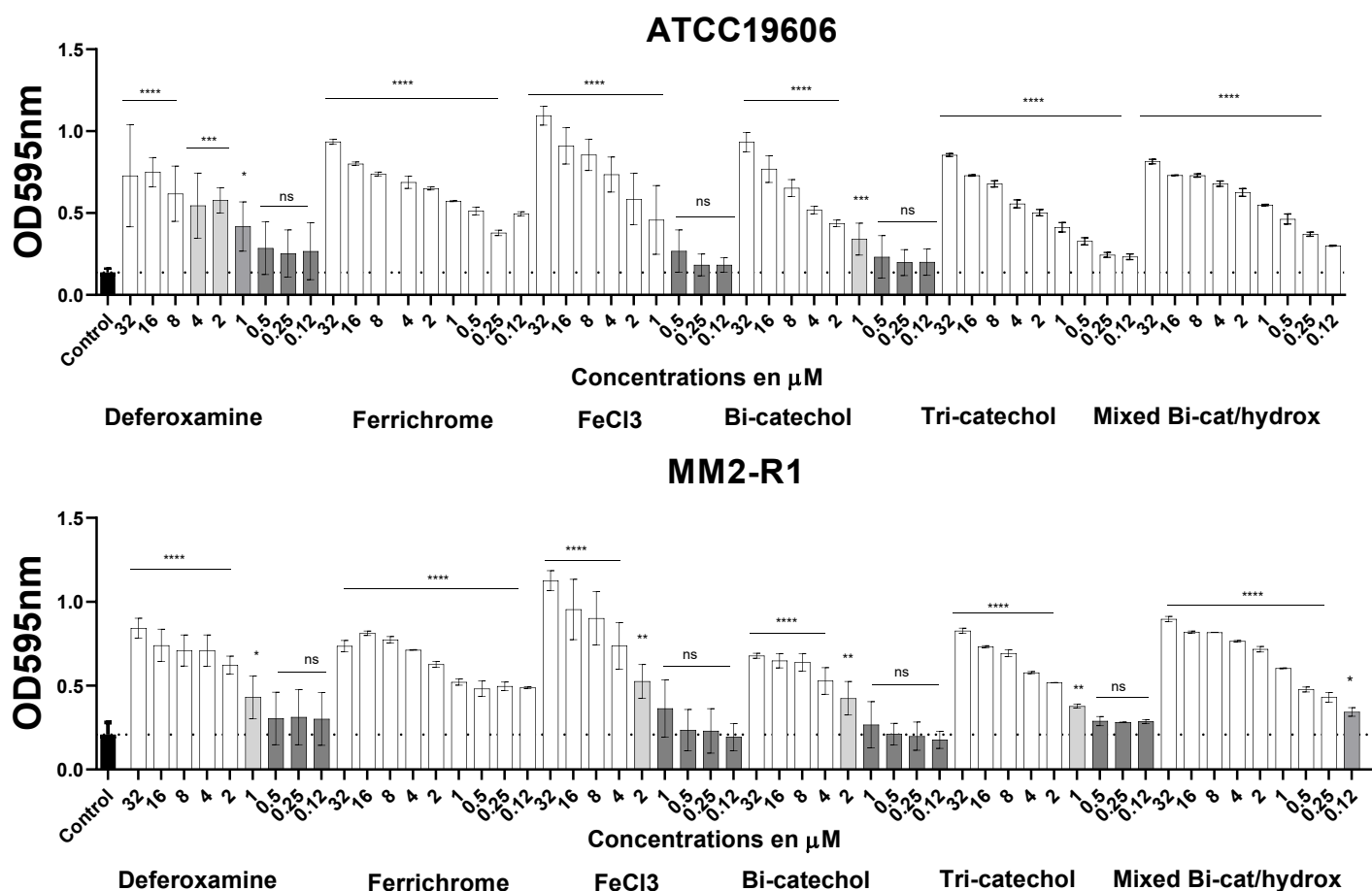


Figure 19: Profils d'utilisation des SID par la souche sauvage ATCC 19606 (haut) et son mutant résistant au SID mixte-DAP, MM2-R1(bas). L'axe des x représente les différents SID testés aux concentrations allant de 0.12 à 32 μM . L'axe des y représente la croissance ou l'utilisation, comme mesurée par la densité optique, des SID par les souches. La colonne en noir représente le puits témoin dans lequel la bactérie est mise en présence du bouillon déplété en fer et sans SID. Les colonnes en blanc et en gris clair représentent les puits avec l'utilisation de SID pour une croissance significative par rapport au puits témoin. Les colonnes en gris représentent les puits dans lesquels l'utilisation du SID pour la croissance n'est pas supérieure au puits témoin. Les données marquées par les étoiles (**** : $p > 0.0001$), (***) : $p = 0.0003$; (**) : $p = 0.006$ et (*) : $p = 0.042$), sont statistiquement supérieures (), comme analysées par

ANOVA, par rapport au témoin. ns : données non statistiquement différentes par rapport au témoin.

Il n'y a de différence observée entre ATCC 19606 et MM2-R1 en présence de deforrixamine, du ferrichrome ainsi du FeCl₃. Le bis-catéchol aussi est utilisé de manière similaire par les deux souches, mais la croissance est moindre chez MM2-R1 (OD max : 0.67 à 32 μ M alors qu'elle de 0.93 à 32 μ M pour ATCC 19606). ATCC 19606 croit normalement avec toutes concentrations utilisées de tris-catéchol ainsi du SID mixte. Cependant, MM2-R1 pousse moins bien en présence de plus faibles concentrations du tris-catéchol.

Dans le bouillon appauvri en fer, le mutant résistant MM2-R1 a plus de difficulté à utiliser certains SID : le bis-catéchol ne lui permet pas d'atteindre le niveau de croissance du parent à de plus hautes concentrations (fig. 22. OD_{595nm} : 0.92 vs 0.67 à 32 μ M du SID bis-catéchol). D'autre part, le parent ATCC 19606 est capable d'utiliser à son avantage toutes les concentrations du tris-catéchol pour mieux pousser par rapport au témoin ; cependant, MM2-R1 éprouve de la difficulté à utiliser le tris-catéchol à de plus faibles concentrations. Finalement, ATCC 19606 est capable d'utiliser à son avantage toutes les concentrations du SID mixte testées, alors que MM2-R1 n'arrive pas à bien pousser à la dernière concentration (0.12 μ M) du SID mixte, le bis-catéchol-monohydroxamate, testé. Ces résultats indiquent que le mutant résistant MM2-R1 est affecté dans son système d'utilisation du fer. Il faut noter que les profils d'utilisation des SID synthétiques par les autres mutants résistants (MM4-R1, MM4-R9, MM3-R1 et MM5-R1) utilisés, dans le modèle d'infection de la souris, ne sont pas différents du mutant résistant MM2-R1 (résultats pas montrés). Ces résultats suggèrent aussi que les mutants résistants auraient plus de difficulté à bien pousser chez l'hôte mammifère où il y a aussi restriction de l'accès au fer. Pour vérifier l'hypothèse que ces mutants résistants survivraient moins bien chez l'hôte mammifère, nous avons utilisé le modèle murin d'infection intrapéritonéale afin de d'imiter l'infection systémique chez l'humain.

4.4 Virulence relative des mutants résistants aux ATB-SID dans un modèle d'infection

chez la souris

Les souris CD-1 femelles âgées d'environ six semaines ont été utilisées dans l'infection péritonéale. Différents inocula ont été préalablement utilisés avec la souche parente d'*A. baumannii* ATCC 19606 afin d'établir l'inoculum optimal pour observer les symptômes de maladie. Ensuite, lorsque j'ai déterminé l'inoculum adéquat pour l'établissement de l'infection, j'ai comparé le fitness de quelques mutants résistants à celui du parent ATCC 19606. Les résultats de l'infection sont présentés dans les fig. 23, 24, 25, 26 et 27.

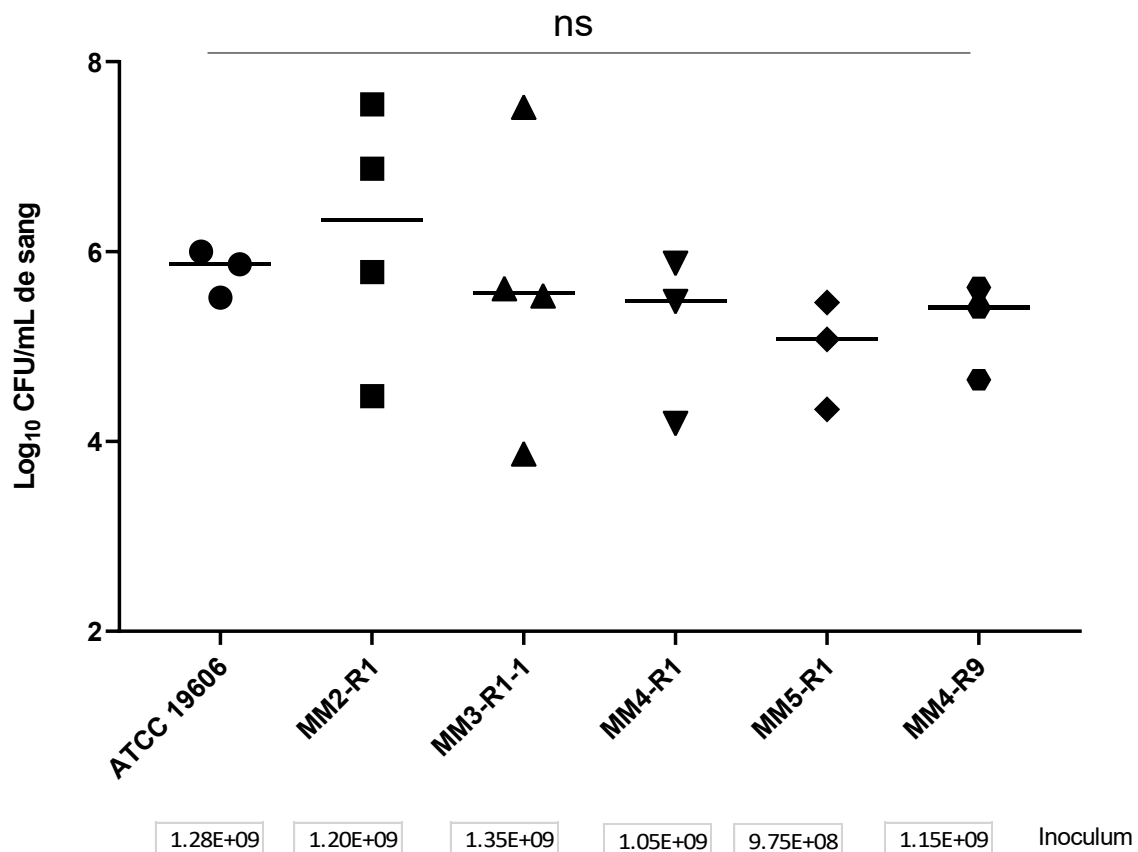


Figure 20: Compte bactérien dans le sang des souris 20h après infection par *A. baumannii* ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.

Compte bactérien dans le sang des souris femelles CD-1 inoculées par le modèle d'infection intrapéritonéale. Les souris ont été sacrifiées 20 heures après infection. Le sang a été collecté puis homogénéisé et ensuite étalé après dilution en série sur les géloses TSA pour les décomptes bactériens. En bas, sur l'axe des abscisses, les différentes souches bactériennes inoculées sont mentionnées. Juste en dessous des souches, ce sont leurs inocula respectifs qui sont indiqués. Les comptes bactériens sont exprimés en Log₁₀ de CFU/mL pour le sang sur l'axe des ordonnées. L'analyse statistique (ANOVA) a révélé qu'il n'y a aucune différence significative (ns) en comptes bactériens entre le parent ATCC 19606 et les mutants résistants testés dans le sang.

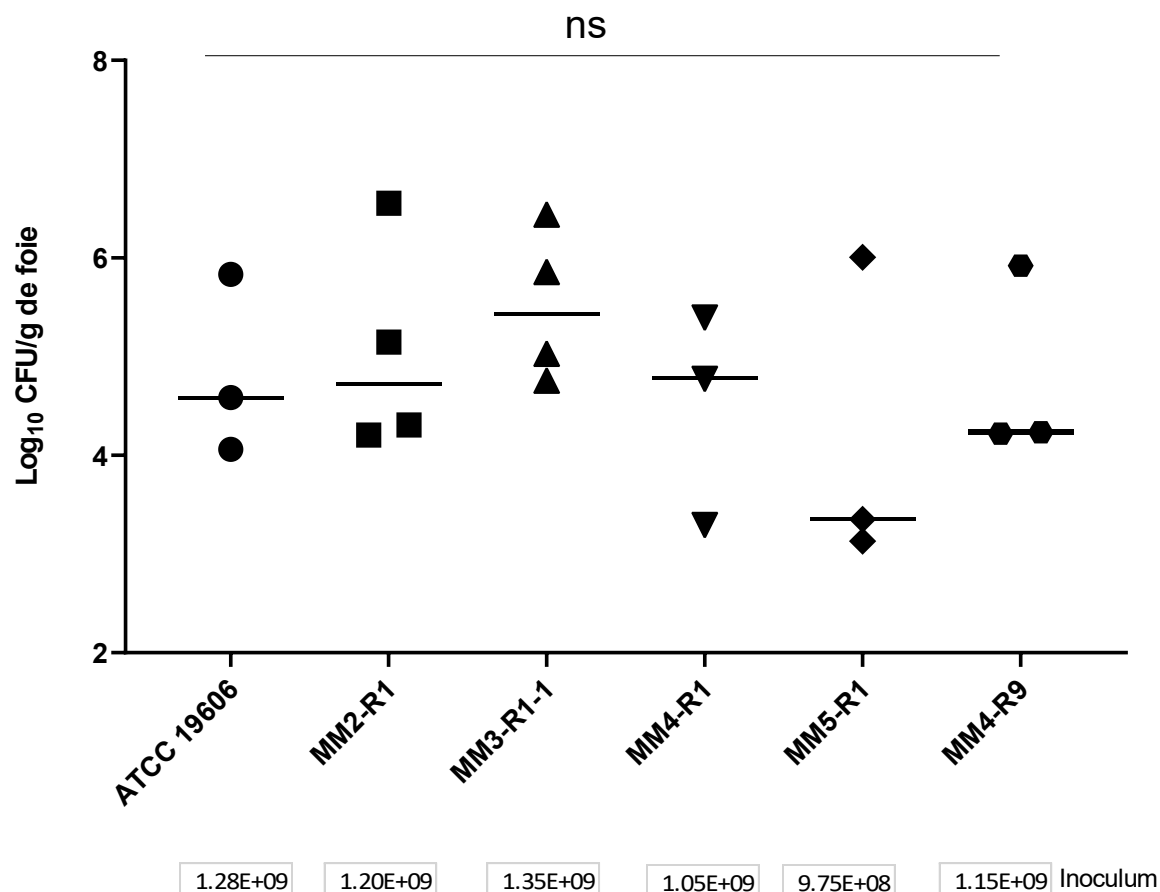


Figure 21: Compte bactérien dans le foie des souris 20h après infection par *A. baumannii* ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.

Compte bactérien dans le foie des souris femelles CD-1 inoculées par le modèle d'infection intrapéritonéale. Les souris ont été sacrifiées 20 heures après infection. Le foie a été collecté puis homogénéisé et ensuite étalé après dilution en série sur les géloses TSA pour les décomptes bactériens. En bas, sur l'axe des abscisses, les différentes souches bactériennes inoculées sont mentionnées. Juste en dessous des souches, ce sont leurs inocula respectifs qui sont indiqués. Les comptes bactériens sont exprimés en Log₁₀ de CFU/g pour le foie sur l'axe des ordonnées. L'analyse statistique (ANOVA) a révélé qu'il n'y a aucune différence

significative (ns) en comptes bactériens entre le parent ATCC 19606 et les mutants résistants testés dans le foie.

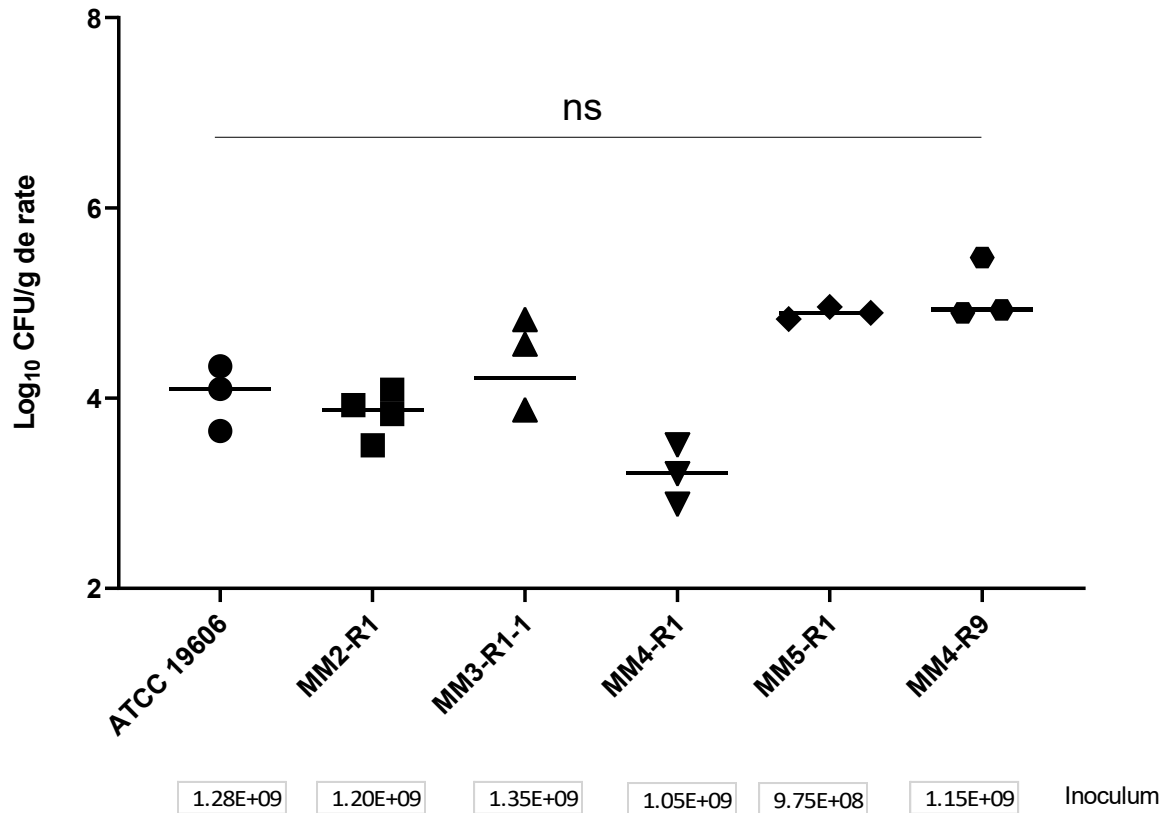


Figure 22: Compte bactérien dans la rate des souris 20h après infection par *A. baumannii* ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.

Compte bactérien dans la rate des souris femelles CD-1 inoculées par le modèle d'infection intrapéritonéale. Les souris ont été sacrifiées 20 heures après infection. La rate a été collectée puis homogénéisée et ensuite étalée après dilution en série sur les géloses TSA pour les décomptes bactériens. En bas, sur l'axe des abscisses, les différentes souches bactériennes inoculées sont mentionnées. Juste en dessous des souches, ce sont leurs inocula respectifs qui

sont indiqués. Les comptes bactériens sont exprimés en Log₁₀ de CFU/g pour la rate sur l'axe des ordonnées. L'analyse statistique (ANOVA) a révélé qu'il n'y a aucune différence significative (ns) en comptes bactériens entre le parent ATCC 19606 et les mutants résistants testés dans la rate.

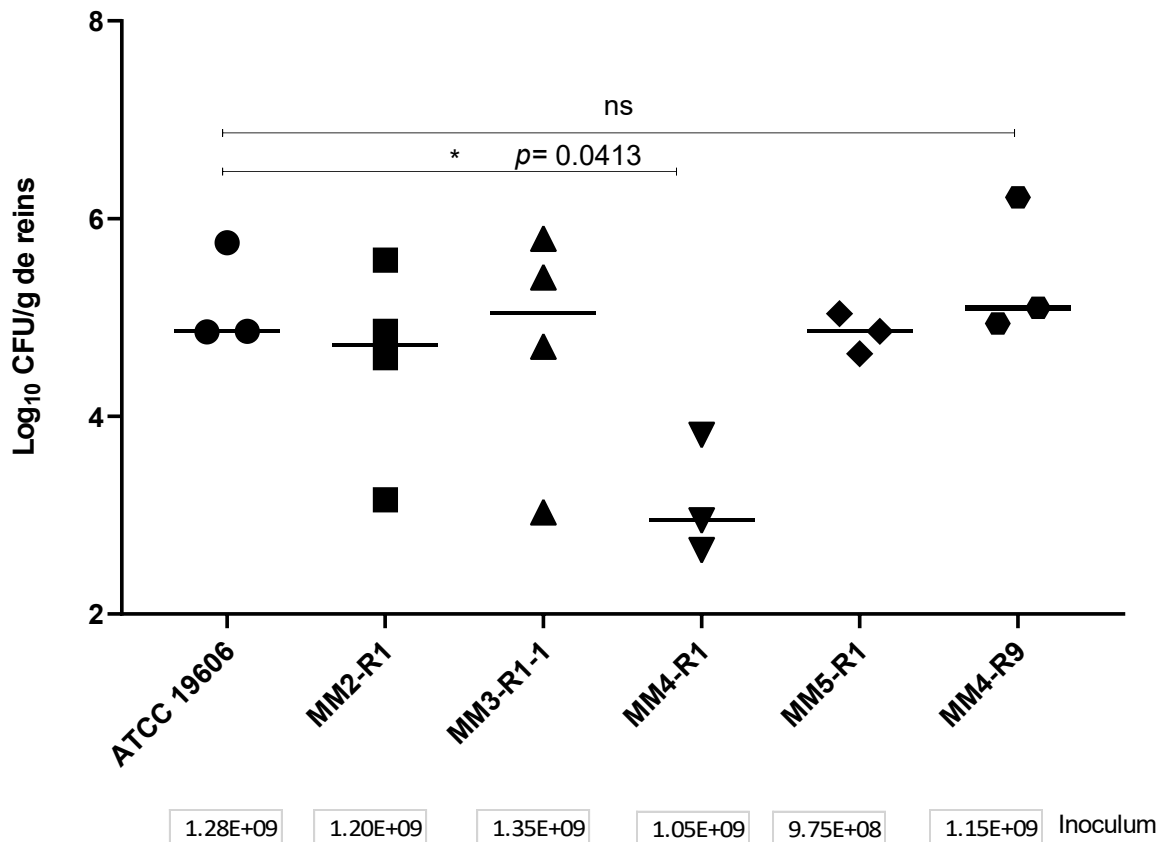


Figure 23: Compte bactérien dans les reins des souris 20h après infection par *A. baumannii* ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.

Compte bactérien dans les reins des souris femelles CD-1 inoculées par le modèle d'infection intrapéritonéale. Les souris ont été sacrifiées 20 heures après infection. Les reins ont été collectés puis homogénéisés et ensuite étalés après dilution en série sur les géloses TSA pour

les décomptes bactériens. En bas, sur l'axe des abscisses, les différentes souches bactériennes inoculées sont mentionnées. Juste en dessous des souches, ce sont leurs inocula respectifs qui sont indiqués. Les comptes bactériens sont exprimés en Log10 de CFU/g pour les reins sur l'axe des ordonnées. L'étoile indique qu'il y a une différence statistiquement significative ($p=0.0413$) de comptes bactériens dans les reins entre le parent et le mutant résistant MM4-R1 testé comme analysé par le test ANOVA. Par ailleurs, il n'y a pas de différence statistiquement significative (ns) entre les comptes bactériens du parent et ceux des autres mutants résistants (ANOVA).

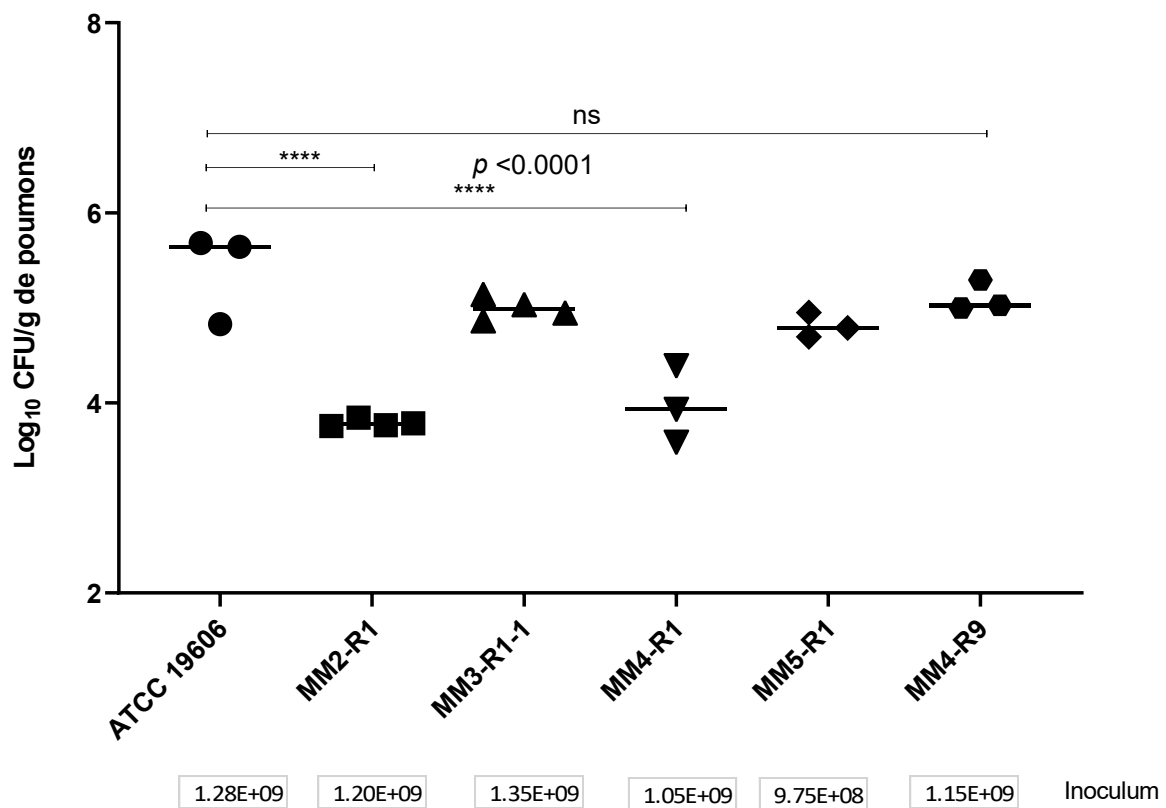


Figure 24: Compte bactérien dans les poumons des souris 20h après infection par *A. baumannii* ATCC 19606 et une série de mutants résistants à des conjugués ATB-SID.

Compte bactérien dans les poumons des souris femelles CD-1 inoculées par le modèle d'infection intrapéritonéale. Les souris ont été sacrifiées 20 heures après infection. Les poumons ont été collectés puis homogénéisés et ensuite étalés après dilution en série sur les géloses TSA pour les décomptes bactériens. En bas, sur l'axe des abscisses, les différentes souches bactériennes inoculées sont mentionnées. Juste en dessous des souches, ce sont leurs inocula respectifs qui sont indiqués. Les comptes bactériens sont exprimés en Log10 de CFU/g pour les poumons sur l'axe des ordonnées. Les étoiles (**** : $p < 0.0001$) indiquent qu'il y a une différence statistiquement significative de comptes bactériens dans les poumons entre le parent et les mutant MM2-R1 et MM4-R1 testés ; ns : pas de différence statistiquement significative entre les comptes bactériens du parent et ceux des autres mutants résistants (MM3-R1, MM4-R9 et MM5-R1) testés, comme analysé par le test ANOVA

Les fig. 23 à 27 représentent les comptes bactériens obtenus des organes des souris après 20 heures d'infection intrapéritonéale. Comme les résultats le montrent, il n'y a pas différence statistiquement significative de comptes bactériens entre le parent ATCC 19606 et tous les mutants résistants utilisés dans les organes dont le sang, le foie et la rate. Cependant, dans les reins et les poumons, il y a une différence statistique observée entre le parent et le mutant MM4-R1. Chez un autre mutant résistant, MM2-R1, on observe également une différence statistiquement significative dans les poumons avec le parent ATCC 19606 ; ces différences de croissance ou d'utilisation des sidérophores synthétiques ont été également observées chez beaucoup de ces mutants résistants *in vitro* (p.ex. MM2-R1, fig. 22), dans un milieu déplété en fer. Ces mutants résistants testés avaient besoin d'une plus concentration de SID pour pousser *in vitro* en milieu déplété en fer, comparativement au parent. Il faut noter qu'il a fallu plusieurs essais d'infection intrapéritonéale avec la souche ATCC 19606 avant de déterminer l'inoculum optimal, avec des doses d'infection élevées indiquant que les souris ne sont naturellement plus susceptibles à la souche d'*A. baumannii* ATCC 19606

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

La résistance aux antibiotiques par les bactéries pathogènes représente une menace sérieuse de santé publique. L'une des bactéries qui constitue justement une menace sérieuse de santé est *Acinetobacter*. Parlant de « menace sérieuse », c'est la conclusion à laquelle est arrivé le CDC dans son classement d'*Acinetobacter* en 2013. En effet, le CDC a trouvé qu'*Acinetobacter* représente une « menace sérieuse » de santé publique car 63% de ses isolats cliniques sont multirésistants, rendant les options thérapeutiques actuelles obsolètes (CDC, 2013). Il est donc impératif de trouver de nouvelles alternatives de soin contre ce pathogène. Étant donné qu'*Acinetobacter*, comme bien d'autres pathogènes, a besoin du fer pour établir une infection, cibler ses systèmes de transport du fer ouvre la voie à l'exploitation d'une des vulnérabilités de la bactérie. Dans les conditions pauvres en fer, telles que rencontrées dans l'hôte mammifère, les bactéries sécrètent des sidérophores pour aller chercher le fer et le leur ramener. Certains de ces sidérophores sont spécifiques aux genres bactériens ou aux espèces bactériennes. Certaines souches d'*A. baumannii* produisent un genre de sidérophore appelé fimsbactine (Proschak et al., 2013b). Nos collaborateurs chimistes à l'Université de Notre-Dame, aux États-Unis, ont synthétisé un analogue de la fimsbactine et l'ont conjugué à la DAP (ATB spécifique contre les bactéries à Gram positif). La raison du choix de la DAP est qu'elle n'est pas utilisée contre les bactéries à Gram négatif et donc n'aurait pas d'historique de résistance chez ce groupe de bactéries. De plus, les fréquences de mutations à la DAP sont très faibles et avec seulement de petites augmentations dans les concentrations minimales inhibitrices (Silverman et al., 2001). Les résultats obtenus montrent que le conjugué obtenu est très efficace spécifiquement contre *A. baumannii* et pas contre les autres bactéries à Gram négatif (Ghosh et al., 2013; Ghosh et al., 2018, 2017).

Le conjugué DAP- sidérophore mixte (HT-10) est très efficace contre la souche d'*A. baumannii* ATCC 19606 comme le montraient les fig. 20 et 21). Dans ces conditions déplétées en fer (200 μ M), les bactéries ne sont pas capables d'aller chercher le fer fourni sous la forme

de FeCl_3 ; en revanche, elles arrivent à bien utiliser les sidérophores qui leur sont fournis, indiquant que c'est la forme complexée du fer qui serait préférée par les bactéries dans ces conditions (fig. 20 et 21). De plus, ces sidérophores permettent aux bactéries de regagner du terrain sur l'effet inhibiteur de HT-10, comme indiqué par la réduction de la zone d'inhibition observée à l'intersection entre la bandelette imbibée de HT-10 et celles imbibées de sidérophores. En revanche, la fig. 19 montre que la DAP seule n'a aucune activité contre *A. baumannii* ; ce qui n'est pas surprenant car la DAP est un ATB à large spectre spécifique contre les bactéries à Gram positif. Par ailleurs, il est rapporté dans la littérature scientifique qu'il n'existe pas de cibles de la DAP chez les bactéries à Gram négatif, une hypothèse fondée sur l'utilisation d'une souche hyperperméable de *E. coli* qui ne montrait pas de susceptibilité à la DAP (Randall et al., 2013). La question que l'on pourrait alors se poser est de savoir comment le conjugué DAP-SID arrive-t-il à tuer *A. baumannii*, étant donné que ce n'est certainement pas la partie sidérophore qui inhibe sa croissance. Bien au contraire, la fig. 22 montre de manière très éloquente qu'*A. baumannii* utilise plutôt bien à son avantage le sidérophore mixte afin de mieux croître dans un milieu déplété en fer, comparativement au témoin (milieu pauvre en fer et en absence de sidérophores). Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du conjugué DAP-SID, une étude génomique approfondie des mutants résistants sélectionnés sur des milieux contenant le conjugué serait bien justifiée. Cependant, les mutants résistants qui nous ont été envoyés par l'Université Notre-Dame, ont été sélectionnés dans des conditions pauvres en fer ; ce qui indiquerait que beaucoup de ces mutations qui seraient survenues toucheraient beaucoup plus les systèmes de transport du fer que les mécanismes de résistance liés à la partie DAP du conjugué. Des efforts devraient donc être consentis afin de sélectionner des mutants résistants dans des milieux riches en fer et contenant le conjugué pour l'évaluation de la meilleure façon qui soit des mécanismes de résistance du conjugué. Cependant, même si ces mutants résistants ont montré une certaine inaptitude *in vitro* à utiliser de manière efficiente les sidérophores (requérant des concentrations supérieures de sidérophores synthétiques afin de croître) dans les conditions pauvres en fer par rapport à la souche sauvage, la plupart des mutants résistants ont plutôt eu de croissances comparables à celle du parent dans la majorité d'organes de souris, dans le modèle d'infection intrapéritonéale. En effet, avec des inocula

d'infection (fig. 23 à 27) très similaires entre les mutants résistants et la souche parente, il n'y a que chez deux mutants (MM2-R1 et MM4-R1, respectivement sélectionnés en présence des conjugués sidérophores mixte-DAP et tris-catéchol-DAP) qui ont vu leurs comptes bactériens diminués par rapport au parent, dans les poumons. Les comptes bactériens de MM4-R1 également ont diminué dans les reins dans ce modèle d'infection par rapport au parent. Cependant, de manière intéressante, MM4-R9 qui est sélectionné en présence du même conjugué (tris-catéchol-DAP) que MM4-R1 semble ne pas être affecté dans son *fitness*, comme indiqué dans les fig. 26 et 27. Cette situation pourrait être justifié par le fait que même si les deux mutants résistants ont été sélectionnés en présence du même conjugué, les mutations chez les deux, comme révélées par les résultats du séquençage, ne sont pas identiques. En effet, MM4-R1 a beaucoup plus de mutations dans un même gène (annoté comme non-caractérisé), comparé à MM4-R9. Ces mutations sont de mutations à haut impact, selon les résultats de séquençage. Bref, il reste que beaucoup d'analyses restent à faire pour confirmer l'impact de ces mutations sur les mutants résistants. De plus, il est fort probable que modèle d'infection intrapéritonéale ne soit le meilleur modèle d'étude pour le *fitness* des mutants résistants. Il serait donc fructueux de tester d'autres modèles d'infection (tissus mous, pulmonaire, etc.) murins afin de mieux établir les différences de virulence entre le parent et les mutants résistants. Le modèle le mieux adapté pourrait donc en ce moment être utilisés pour tester l'efficacité des conjugués reçus de l'Université de Notre Dame.

Par ailleurs, chez la plante modèle *A. thaliana*, le sidérophore synthétique mixte (le bis-catéchol-monohydroxamate), analogue du sidérophore naturel fimsbactine produit par *Acinetobacter* spp., a montré des effets antimicrobiens contre le phytopathogène *Pst* DC3000 et promu la croissance du PGPR *B. subtilis*, *in vitro* ; et a agi comme un éliciteur de la réponse de défense systémique chez *Arabidopsis*.

Toutes ces expériences ont permis de montrer combien les sidérophores pourraient être exploités de diverses manières pour régler les problèmes causés par les bactéries pathogènes, aussi bien humaines que celles affectant les plantes ; donc leurs applications en agriculture aussi bien qu'en santé humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208.
- Althaus, E. W., Outten, C. E., Olson, K. E., Cao, H., & O'Halloran, T. V. (1999). The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*, 38(20), 6559–6569.
- Álvarez-Fraga, L., Vázquez-Ucha, J. C., Martínez-Gutián, M., Vallejo, J. A., Bou, G., Beceiro, A., & Poza, M. (2018). Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 9(1), 496–509.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 215–237.
- Antunes, L. C. S., Imperi, F., Towner, K. J., & Visca, P. (2011). Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Research in Microbiology*, 162(3), 279–284.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* 6(10), 973–979.
- Aznar, A., Chen, N. W. G., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaele, D., ... Dellagi, A. (2014). Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. *Plant Physiology*, 164(4), 2167–2183.
- Aznar, Aude, Chen, N. W. G., Thomine, S., & Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Science*. 240, 90-97
- Aznar, Aude, & Dellagi, A. (2015). New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: What can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3001–3010.
- Bags, A., & Neilands, J. B. (1987). Ferric Uptake Regulation Protein Acts as a Repressor, Employing Iron(II) as a Cofactor To Bind the Operator of an Iron Transport Operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26(17), 5471–5477.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & van Loon, L. C. (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. . *Phytopathology*, 97(2), 239–243.
- Bar-ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A., & Libman, J. (1992). Iron Uptake by Plants from Microbial Siderophores. *Plant Physiology*, 99, 1329–1335.
- Barash, I., Zion, R., Krikun, J., & Nachmias, A. (1988). Effect of iron status on verticillium wilt disease and on *in vitro* production of siderophores by *verticillium dahliae*. *Journal of Plant Nutrition*, 11(6–11), 893–905.
- Bashir, K., Inoue, H., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2006). Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32395–32402.
- Bernsdorff, F., Döring, A. C., Gruner, K., Schuck, S., Bräutigam, A., & Zeier, J. (2016). Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-

- dependent and -independent pathways. *Plant Cell*, 28(1), 102–129.
- Binder, B. M. (2008). The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. *Plant Science*, 175(1–2), 8–17.
- Bohac, T. J., Fang, L., Giblin, D. E., & Wencewicz, T. A. (2019). Fimsbactin and Acinetobactin Compete for the Periplasmic Siderophore Binding Protein BauB in Pathogenic *Acinetobacter baumannii*. *ACS Chemical Biology*, 14(4), 674–687.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 379–406.
- Braun, V., Gunthner, K., Hantke, K., & Zimmermann, L. (1983). Intracellular activation of albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 156(1), 308–315.
- Braun, Volkmar, Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M., & Bohn, E. (2009). Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 22(1), 3–13.
- Brochu, A., Brochu, N., Nicas, T. I., Parr, T. R., Minnick, A. A., Dolence, E. K., ... Malouin, F. (1992). Modes of action and inhibitory activities of new siderophore- β -lactam conjugates that use specific iron uptake pathways for entry into bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(10), 2166–2175.
- Broekgaarden, C., Caarls, L., Vos, I. A., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2015). Ethylene: Traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology*, 169(4), 2371–2379.
- Browse, J. (2005). Jasmonate: An Oxylin Signal with Many Roles in Plants. *Vitamins and Hormones*, 72(05), 431–456.
- Cecchini, Nicolás M., Roychoudhry, S., Speed, D. J., Steffes, K., Tambe, A., Zoderow, K., ... Greenberg, J. T. (2019). Underground Azelaic Acid-Conferred Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(1), 86–94.
- Cecchini, Nicolas M., Steffes, K., Schlappi, M. R., Gifford, A. N., & Greenberg, J. T. (2015). *Arabidopsis* AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nature Communications*, 6:7658.
- Centers for Disease Control and Prevention (2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*
- Cescau, S., Cwerman, H., Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C., & Biville, F. (2007). Heme acquisition by hemophores. *BioMetals*, 20(3–4), 603–613.
- Charron, J.-B. F., Ouellet, F., Houde, M., & Sarhan, F. (2008). The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biology*, 8, 86.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., ... Zhou, J.-M. (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 21(8), 2527–2540.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and

- emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28.
- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–10.
- Cointry, V; Vert, G (2019). The bifunctional transporter-receptor IRT1 at the heart of metal sensing and signalling. *New Phytologist*, 223: 1173–1178
- Compant, Stéphane, Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678.
- Compant, Stephane, Duffy, B., Nowak, J., Christophe, C., & Barka, Ait, E. (2005). PAS 100:2011 Specification for Composted Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 1–68.
- Connorton, J. M., Balk, J., & Rodríguez-Celma, J. (2017). Iron homeostasis in plants-a brief overview. *Metallomics*, 9(7), 813–823.
- Conroy, B. S., Grigg, J. C., Kolesnikov, M., Morales, L. D., & Murphy, M. E. P. (2019). *Staphylococcus aureus* heme and siderophore-iron acquisition pathways. *BioMetals*, 32(3): 409-424
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C., & Vinckx, T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, 3(6), 540–549.
- Coy, M., & Neilands, J. B. (1991). Structural Dynamics and Functional Domains of the Fur Protein. *Biochemistry*, 30(33), 8201–8210.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402–1419..
- Dangle, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence in plants. *Nature*, 411(6839), 826–833.
- Daniel, C., Haentjens, S., Bissinger, M.-C., & Courcol, R. J. (1999). Characterization of the *Acinetobacter baumannii* Fur regulator: cloning and sequencing of the *fur* homolog gene. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 199–209.
- Davenport, K. W., Daligault, H. E., Minogue, T. D., Bruce, D. C., Chain, P. S. G., Coyne, S. R., ... Johnson, S. L. (2014). Draft genome assembly of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *Genome Announcements*, 2(4), 10–11.
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in *Arabidopsis* during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiology*, 150(4), 1687–1696.
- Dellagi, Alia, Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., ... Expert, D. (2005). Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant Journal*, 43(2), 262–272.
- Diarra, M. S., Lavoie, M. C., Jacques, M., Darwish, I., Dolence, E. K., Dolence, J. A., ... Malouin, F. (1996). Species Selectivity of New Siderophore-Drug Conjugates That Use Specific Iron Uptake

- for Entry into Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2610–2617.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548.
- Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H., & Actis, L. A. (2004a). The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*, 150(11), 3657–3667.
- Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H., & Actis, L. A. (2004b). The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*, 150(11), 3657–3667.
- E. Crowley, D. (2006). Microbial Siderophores in the Plant Rhizosphere. In: Barton L.L., Abadia J. (eds) *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, 169–198. Springer, Dordrecht
- Eijkelkamp, B. A., Hassan, K. A., Paulsen, I. T., & Brown, M. H. (2011a). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*, 12(1), 126.
- Eijkelkamp, B. A., Hassan, K. A., Paulsen, I. T., & Brown, M. H. (2011b). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*, 12:126.
- Erwin, M. E., Jones, R. N., Barrett, M. S., Briggs, B. M., & Johnson, D. M. (1991). *In vitro* evaluation of GR69153, a novel catechol-substituted cephalosporin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(5), 929–937.
- Expert, D., Franza, T., Dellagi, A., & Walker, J. M. (2012). Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations. Eds. Expert, D and O'Brian, M. R *Iron in Plant-Pathogen Interactions*, 7-39. Springer, Dordrecht.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., ... Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432(7019), 917–921.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 344–350.
- Franza, T., & Expert, D. (2013). Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: An “à la carte” menu. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 429–438.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 839–863.
- Funahashi, T., Tanabe, T., Mihara, K., Miyamoto, K., Tsujibo, H., & Yamamoto, S. (2012). Identification and Characterization of an Outer Membrane Receptor Gene in *Acinetobacter baumannii* Required for Utilization of Desferricoprofen, Rhodotorulic Acid, and Desferrioxamine B as Xenosiderophores. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(5), 753–760.

- Gaddy, J. A., Actis, L. A., Arivett, B. A., McConnell, M. J., Rafael, L. R., & Pachón, J. (2012). Role of Acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infection and Immunity*, 80(3), 1015–1024.
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., & Schalk, I. J. (2017). Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chemical Biology*, 12(4), 1056–1065.
- Ghazi, I. M., Monogue, M. L., Tsuji, M., & Nicolau, D. P. (2018). Humanized Exposures of Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, Display Sustained in vivo Activity against Siderophore-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacology*, 101(5–6), 278–284.
- Ghosh, A., Ghosh, M., Niu, C., Malouin, F., Moellmann, U., & Miller, M. J. (1996). Iron transport-mediated drug delivery using mixed-ligand siderophore- β -lactam conjugates. *Chemistry and Biology*, 3(12), 1011–1019.
- Ghosh, M., Miller, P., Möllmann, U., Claypool, W., & Miller, M. J. (2013). Siderophore Substitution on Daptomycin Confers Anti- *Acinetobacter baumannii* Bacterial Activity Both in vitro and in vivo. *ICAAC 2013 Poster*, 4052.
- Ghosh, Manuka, Lin, Y. M., Miller, P. A., Möllmann, U., Boggess, W., & Miller, M. J. (2018). Siderophore Conjugates of Daptomycin are Potent Inhibitors of Carbapenem Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infectious Diseases*, 4(10), 1529–1535
- Ghosh, Manuka, & Miller, M. J. (1996). Synthesis and In Vitro Antibacterial Activity of Spermidine-Based Mixed Catechol- and Hydroxamate-Containing Siderophore-Vancomycin Conjugates, 4(1), 43–48.
- Ghosh, Manuka, Miller, P. A., Möllmann, U., Claypool, W. D., Schroeder, V. A., Wolter, W. R., ... Miller, M. J. (2017). Targeted Antibiotic Delivery: Selective Siderophore Conjugation with Daptomycin Confers Potent Activity against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Both in Vitro and in Vivo. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(11), 4577–4583.
- Gillor, O., Kirkup, B. C., & Riley, M. A. (2004). Colicins and microcins: The next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 129–146.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109–117.
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28(3), 367–374.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., & Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell*, 24(2), 672–777.
- Grandchamp, GM; Caro, L; Shank, E. (2017). Pirated Siderophores Promote Sporulation in *Bacillus subtilis*, 83(10), 1–17.

- Guerinot, M. Lou, & Yi, Y. (1994). Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol*, 104, 815–820.
- Hackel, M. A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J. A., & Sahm, D. F. (2019). Reproducibility of broth microdilution MICs for the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, determined using iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(4), 321–325.
- Hackel, M. A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J. A., & Sahma, D. F. (2017). In vitro activity of the siderophore cephalosporin, cefiderocol, against a recent collection of clinically relevant gram-negative Bacilli from North America and Europe, including carbapenem-nonsusceptible isolates (SIDERO-WT-2014 study). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9).
- Hamid, M., Der Sluis Ientse, V., Leender c, V. L., Monica, H., & Petwe A.h.m, B. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 6(2), 177–185.
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L. A., Shanzer, A., & Schalk, I. J. (2010). The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1212–1220.
- Hartmann, M., Zeier, T., Bernsdorff, F., Reichel-Deland, V., Kim, D., Hohmann, M., ... Zeier, J. (2018). Flavon Monooxygenase-Generated N-Hydroxytyrosine Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell*, 173(2), 456–469.e16.
- Hasan, T., Choi, C. H., & Oh, M. H. (2015). Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics & Informatics*, 13(1), 2–6.
- Heinisch, L., Wittmann, S., Stoiber, T., Berg, A., Ankel-Fuchs, D., & Möllmann, U. (2002). Highly antibacterial active aminoacyl penicillin conjugates with acylated bis-catecholate siderophores based on secondary diamino acids and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(14), 3032–3040.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657.
- Hindt, M. N., & Guerinot, M. Lou. (2012). Getting a sense for signals: Regulation of the plant iron deficiency response. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1521–1530.
- Hoffmann, R. D., Olsen, L. I., Ezike, C. V., Pedersen, J. T., Manstretta, R., López-Marqués, R. L., & Palmgren, M. (2018). Roles of plasma membrane proton ATPases AHA2 and AHA7 in normal growth of roots and root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 166(3): 848–861
- Houhamdi, L., & Raoult, D. (2006). Experimental Infection of Human Body Lice With. *Tropical Medicine*, 74(4), 526–531.
- Ito, A., Nishikawa, T., Yamano, Y., Matsumoto, S., Yoshizawa, H., Sato, T., ... Tsuji, M. (2016). Transporter Systems for Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7396–7401.

- Ivanov, R., Brumbarova, T., & Bauer, P. (2012). Fitting into the harsh reality: Regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Molecular Plant*, 5(1), 27–42.
- Jacques, J. F., Jang, S., Prévost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., & Massé, E. (2006). RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1181–1190.
- Ji, C., & Miller, M. J. (2012). Chemical syntheses and *in vitro* antibacterial activity of two desferrioxamine B-ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(12), 3828–3836.
- Jia, L., Jianggi, W., Kevin, A. L., Jason, T. D., Franse, E. T., & John, C. W. (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110, 213–222.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006a). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006b). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009) Priming in Systemic Plant Immunity. *Science*, 324(5923), 89–91.
- Katsube, T., Echols, R., Arjona Ferreira, J. C., Krenz, H. K., Berg, J. K., & Galloway, C. (2017). Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacterial Infections: Pharmacokinetics and Safety in Subjects With Renal Impairment. *Journal of Clinical Pharmacology*, 57(5), 584–591.
- Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-Côte, E., Kunz, C., ... Dellagi, A. (2012). Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 13(8), 816–827.
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, 11(3), 1–19.
- Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Höfle, G., & Reichenbach, H. (1989). Myxochelin A, A New Iron-chelating Compound from *Angiococcus Disciformis* (Myxobacterales). *J. Antibiot.*, (40), 14–17.
- Kunze, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *The Plant Cell Online*, 16(12), 3496–3507.
- Lau, C. K. Y., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: The Feo system. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 273–298.
- Lee, J. W., & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the fur family of metalloregulators. *BioMetals*, 20(3–4), 485–499.
- Leeman, M., Den Ouden, E. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 86(2), 149–155.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.

- Liu, R., Miller, P. A., Vakulenko, S. B., Stewart, N. K., Boggess, W. C., & Miller, M. J. (2018). A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram-Negative Bacteria to Commit Suicide with a Gram-Positive Antibiotic. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(9), 3845–3854.
- Luscher, A., Moynié, L., Auguste, S., Bumann, D., & Mazza, L. (2018). TonB-Dependent Receptor Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for Uptake of Siderophore-Drug Conjugates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 1–11.
- M, L. D., Dasharath, P., H, M. M., D, K. J., G, P. N., K, K. P., ... Suresh, P. (2016). Influence of phytosiderophore on iron and zinc uptake and rhizospheric microbial activity. *African Journal of Microbiology Research*, 7(51), 5781–5788.
- Maresso, A. W., & Schneewind, O. (2006). Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *BioMetals*, 19(2), 193–203.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., & Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5–6), 433–439.
- McConnell, M. J., Actis, L., & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 130–155.
- McPherson, C. J., Aschenbrenner, L. M., Lacey, B. M., Fahnoe, K. C., Lemmon, M. M., Finegan, S. M., ... Tomaras, A. P. (2012). Clinically Relevant Gram-Negative Resistance Mechanisms Have No Effect on the Efficacy of MC-1, a Novel Siderophore-Conjugated Monocarbam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6334–6342.
- Md-Saleh, S. R., Chilvers, E. C., Kerr, K. G., Milner, S. J., Snelling, A. M., Weber, J. P., ... Routledge, A. (2009). Synthesis of citrate-ciprofloxacin conjugates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(5), 1496–1498.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, 126(5), 969–980.
- Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, 70(13–14), 1560–1570.
- Miethke, M. (2013). Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 5(1), 15–28.
- Mihara, K., Tanabe, T., Yamakawa, Y., Funahashi, T., Nakao, H., Narimatsu, S., & Yamamoto, S. (2004a). Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. *Microbiology*, 150(8), 2587–2597.
- Mihara, K., Tanabe, T., Yamakawa, Y., Funahashi, T., Nakao, H., Narimatsu, S., & Yamamoto, S. (2004b). Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. *Microbiology*, 150(8), 2587–2597.
- Miller, M. J., Wencewicz, T. A., Long, T. E., & Möllmann, U. (2013). Trihydroxamate Siderophore-Fluoroquinolone Conjugates are Selective Sideromycin Antibiotics that Target *Staphylococcus*

aureus. *Bioconjugate Chemistry*, 24(3); 473–486

- Milner, S. J., Seve, A., Snelling, A. M., Thomas, G. H., Kerr, K. G., Routledge, A., & Duhme-Klair, A. K. (2013). Staphyloferrin A as siderophore-component in fluoroquinolone-based Trojan horse antibiotics. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11(21), 3461–3468.
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2006). The Arabidopsis Flavin-Dependent Monooxygenase FMO1 Is an Essential Component of Biologically Induced Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 141(4), 1666–1675.
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Journal*, 50(3), 500–513.
- Möhlmann, U., Heinisch, L., Bauernfeind, A., Köhler, T., & Ankel-Fuchs, D. (2009). Siderophores as drug delivery agents: Application of the “trojan Horse” strategy. *BioMetals*, 22(4), 615–624.
- Morgenthau, A., Pogoutse, A., Adamiak, P., Moraes, T. F., & Schryvers, A. B. (2013). Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: molecular mechanisms and role in host–microbe interactions. *Future Medicine*, 8(12); 1575–1585.
- Morrissey, J., & Gueriot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem Rev*, 109(10), 4553–4567.
- Morrissey, Joe, & Gueriot, M. Lou. (2009). Iron Uptake and Transport in Plants. *Plant Membrane and Vacuolar Transporters*, 109(10), 149–172.
- Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 511–517.
- Moynié, L., Serra, I., Scorciapino, M. A., Oueis, E., Page, M. G., Ceccarelli, M., & Naismith, J. H. (2018). Preacinetobactin not acinetobactin is essential for iron uptake by the BauA transporter of the pathogen *Acinetobacter baumannii*. *ELife*, 7, 1–16.
- Mukherjee, I., Campbell, N. H., Ash, J. S., & Connolly, E. L. (2006). Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta*, 223(6), 1178–1190.
- Müller, A., Wenzel, M., Strahl, H., Grein, F., Saaki, T. N. V., Kohl, B., ... Hamoen, L. W. (2016). Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), E7077–E7086.
- Mushtaq, S., Warner, M., & Livermore, D. (2009). Activity of the siderophore monobactam BAL30072 against multiresistant non-fermenters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 266–270.
- Newman, D. L., & Shapiro, J. A. (1999). Differential *fiu-lacZ* fusion regulation linked to *Escherichia coli* colony development. *Molecular Microbiology*, 33(1), 18–32.
- Niesch, J., & Kniisel, F. (1967). Niesch and F. Kniisel. Sideromycins. In: Gottlieb D., Shaw P.D. (eds) Antibiotics. Springer, Berlin, Heidelberg
- Noël, S., Gasser, V., Pesset, B., Hoegy, F., Rognan, D., Schalk, I. J., & Mislin, G. L. A. (2011).

- Synthesis and biological properties of conjugates between fluoroquinolones and a N³'-functionalized pyochelin. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(24), 8288–8300.
- Nürnberg, T., & Kemmerling, B. (2006). Receptor protein kinases - pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends in Plant Science*, 11(11), 519–522.
- Ohata, T., Kanazawa, K., Mihashi, S., Kishi-Nishizawa, N., Fushiya, S., Nozoe, S., ... Mihashi, S. (1993). Biosynthetic pathway of phytosiderophores in iron-deficient graminaceous plants: Development of an assay system for the detection of nicotianamine aminotransferase activity. *Soil Science and Plant Nutrition*, 39(4), 745–749.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., & Turgeon, B. G. (2006). NPS6, Encoding a Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in Siderophore-Mediated Iron Metabolism, Is a Conserved Virulence Determinant of Plant Pathogenic *Ascomycetes*. *The Plant Cell*, 18(10), 2836–2853.
- Page, M. G. P., Dantier, C., & Desarbre, E. (2010). In vitro properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multiresistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2291–2302.
- Palmgren, M. G. (2002). PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 817–845.
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., ... Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, 464(7289), 788–791.
- Penwell, W. F., Arivett, B. A., & Actis, L. A. (2012a). The *Acinetobacter baumannii* enta gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. *PLoS ONE*, 7(5): e36493. doi: 10.1371/journal.pone.0036493
- Penwell, W. F., Arivett, B. A., & Actis, L. A. (2012b). The *Acinetobacter baumannii* enta gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. *PLoS ONE*, 7(5): e36493. doi: 10.1371/journal.pone.0036493
- Penwell, W. F., Degrace, N., Tentarelli, S., Gauthier, L., Gilbert, C. M., Arivett, B. A., ... Actis, L. A. (2015). Discovery and Characterization of New Hydroxamate Siderophores, Baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *ChemBioChem*, 16(13), 1896–1904.
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347–375.
- Portsmouth, S., van Veenhuizen, D., Echols, R., Machida, M., Ferreira, J. C. A., Ariyasu, M., ... Nagata, T. Den. (2018). Cefiderocol versus imipenem-cilastatin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative uropathogens: a phase 2, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(12), 1319–1328.

- Postle, K., & Kadner, R. J. (2003). Touch and go: Tying TonB to transport. *Molecular Microbiology*, 49(4), 869–882.
- Pramanik, A., & Braun, V. (2006). Albomycin uptake via a ferric hydroxamate transport system of *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3878–3886.
- Proschak, A., Lubuta, P., Grün, P., Löhr, F., Wilharm, G., De Berardinis, V., & Bode, H. B. (2013a). Structure and Biosynthesis of Fimsbactins A-F, Siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem*, 14(5), 633–638.
- Proschak, A., Lubuta, P., Grün, P., Löhr, F., Wilharm, G., De Berardinis, V., & Bode, H. B. (2013b). Structure and Biosynthesis of Fimsbactins A-F, Siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem*, 14(5), 633–638.
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 637–639.
- Raymond, K. N., Allred, B. E., & Sia, A. K. (2015). Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport. *Accounts of Chemical Research*, 48(9), 2496–2505.
- Rebuffat, S. (2012). Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1456–1462.
- Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081.
- Rivera, G. S. M., Beamish, C. R., & Wencewicz, T. A. (2018). Immobilized FhuD2 Siderophore-Binding Protein Enables Purification of Salmycin Sideromycins from *Streptomyces violaceus* DSM 8286. *ACS Infectious Diseases*, 4(5), 845–859.
- Rodrigue, S., Materna, A. C., Timberlake, S. C., Blackburn, M. C., Malmstrom, R. R., Alm, E. J., & Chisholm, S. W. (2010). Unlocking short read sequencing for metagenomics. *PLoS ONE*, 5(7).
- Roosenberg, J. M., Lin, Y., Lu, Y., & Miller, M. J. (2000). Studies and Syntheses of Siderophores , Microbial Chelators , and Analogs as Potential Drug Delivery Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 7(2): 159-197
- Runci, F., Gentile, V., Frangipani, E., Rampioni, G., Leoni, L., Lucidi, M., ... Visca, P. (2019). Contribution of Active Iron Uptake to *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity . *Infection and Immunity*, 87(4), 1–16.
- Runyen-janecky, L. J., Eichenbaum, Z., & State, G. (2013). Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens, 3(October), 1–11.
- Santi, S., & Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytologist*, 183(4), 1072–1084.
- Sato, T., Ota, M., Takemura, M., Nishikawa, T., Kohira, N., Miyagawa, S., ... Yamano, Y (2017). In vitro antibacterial properties of cefiderocol , a novel siderophore cephalosporin , against Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(1); e01454-17
- Schalk, I. J. (2018). A Trojan-Horse Strategy Including a Bacterial Suicide Action for the Efficient

- Use of a Specific Gram-Positive Antibiotic on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(9), 3842–3844..
- Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1661–1673.
- Shapiro, J. A., & Wencewicz, T. A. (2016). Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-Triggered Siderophore Swapping. *ACS Infectious Diseases*, 2(2), 157–168.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., ... Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400–407.
- Shen, C., Yang, Y., Liu, K., Zhang, L., Guo, H., Sun, T., & Wang, H. (2016). Involvement of endogenous salicylic acid in iron-deficiency responses in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(14), 4179–4193.
- Silverman, J. A., Oliver, N., Andrew, T., Andrew, T. E. D., & Li, T. (2001). Resistance Studies with Daptomycin These include : Resistance Studies with Daptomycin, 45(6), 1799–1802.
- Staiger, D. (2002). Chemical strategies for iron acquisition in plants. *Angewandte Chemie - International Edition*, 41(13), 2259–2264.
- Subashchandrabose, S., Smith, S., DeOrnellas, V., Crepin, S., Kole, M., Zahdeh, C., & Mobley, H. L. T. (2016). *Acinetobacter baumannii* Genes Required for Bacterial Survival during Bloodstream Infection. *MSphere*, 1(1), e00013-15.
- Sugiura, Y., & Nomoto, K. (2007). Phytosiderophores structures and properties of mugineic acids and their metal complexes. *Siderophores from Microorganisms and Plants*, 107–135.
- Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2010). The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 117–126.
- Tak, H. I., Ahmad, F., & Babalola, O. O. (2014). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 228, 228, 33–52.
- Taylor, S. D., & Palmer, M. (2016). The action mechanism of daptomycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(24), 6253–6268.
- Thomine, S., & Lanquar, V. (2011). *Transporters and Pumps in Plant Signaling* (Vol. 7).
- Thomine, Sébastien, & Vert, G. (2013). Iron transport in plants: Better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 322–327.
- Tillotson, G. S. (2016). Trojan Horse Antibiotics—A Novel Way to Circumvent Gram-Negative Bacterial Resistance? *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 9, IDRT.S31567.
- Tomaras, A. P., Crandon, J. L., McPherson, C. J., & Nicolau, D. P. (2015). Potentiation of Antibacterial Activity of the MB-1 Siderophore-Monobactam Conjugate Using an Efflux Pump Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2439–2442.

- Troxell, B., Xu, H., & Yang, X. F. (2012). *Borrelia burgdorferi*, a pathogen that lacks iron, encodes manganese-dependent superoxide dismutase essential for resistance to streptonigrin. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19284–19293.
- Tsuda, K., & Somssich, I. E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist*, 206(3), 932–947.
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., ... Cruveiller, S. (2008). Comparative analysis of acinetobacters: Three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE*, 3(3).
- van Delden, C., Page, M. G. P., & Köhler, T. (2013). Involvement of Fe Uptake Systems and AmpC β -Lactamase in Susceptibility to the Siderophore Monosulfactam BAL30072 in *Pseudomonas Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5): 2095-2102
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C., & Lemanceau, P. (2007a). Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 441–447.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C., & Lemanceau, P. (2007b). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 441–447.
- Verbon, E. H., Trapet, P. L., Stringlis, I. A., Kruijs, S., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2017). Iron and Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), annurev-phyto-080516-035537.
- Vértesy, L., Aretz, W., Fehlhaber, H. -W, & Kogler, H. (1995). Salmycin A–D, Antibiotika aus *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur. *Helvetica Chimica Acta*, 78(1), 46–60.
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2019). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1):3-17.
- Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2018). Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. *Plant Cell Reports*, 37(11), 1557–1569.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24.
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 611–647.
- Weinberg, E. D. (2015). The *Lactobacillus* Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine*, 40(4), 578–583.
- Weinstein, M. P. (2018). *M07. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.
- Wencewicz, T. A., & Miller, M. J. (2013). Biscatecholate-monohydroxamate mixed ligand siderophore-carbacephalosporin conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(10), 4044–4052.
- White, P., Joshi, A., Rassam, P., Housden, N. G., Kaminska, R., Goult, J. D., ... Kleanthous, C.

- (2017). Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45), 12051–12056.
- Wittmann, S., Schnabelrauch, M., Scherlitz-Hofmann, I., Möllmann, U., Ankel-Fuchs, D., & Heinisch, L. (2002). New synthetic siderophores and their β -lactam conjugates based on diamino acids and dipeptides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(6), 1659–1670.
- Yan, S., & Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 64–68.
- Zgurskaya, H. I., López, C. A., & Gnanakaran, S. (2016). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches to Bypass It. *ACS Infectious Diseases*, 1(11), 512–522.
- Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., ... & Karlowsky, J. A. (2019). Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs*, 79(3), 271–289.
- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M. S., Dowd, S. E., & Paré, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant Journal*, 58(4), 568–577.
- Zimble, D. L., Arivett, B. A., Beckett, A. C., Menke, S. M., & Actis, L. A. (2013). Functional Features of TonB Energy Transduction Systems of *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Immunity*, 81(9), 3382–3394.
- Zimble, D. L., Penwell, W. F., Gaddy, J. A., Menke, S. M., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., & Actis, L. A. (2009). Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *BioMetals*, 22(1), 23–32.

